

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser

**Einfluss von Inhibitoren
auf Tryptase β in HMC-1 Mastzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florence Bieringer
aus
Sankt Ingbert
2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Peter Fraunberger
PD Dr. med. Johannes Zander

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen

Prüfung: 16.01.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Einfluss von Inhibitoren auf Tryptase β in HMC-1 Mastzellen“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bonn, 02.01.2019

Florence Bieringer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung	13
2	Einleitung	15
2.1	Die Mastzelle	15
2.1.1	Physiologie und Pathophysiologie von Mastzellen	15
2.2	Die HMC-1 Mastzelllinie.....	17
2.3	Mastzellproteasen.....	18
2.3.1	Mastzelltryptasen.....	18
2.3.2	Cathepsin C.....	23
2.3.3	Weitere Mastzellproteasen	24
2.4	Inhibitoren von Tryptase β	25
2.4.1	LDTI und TDPI.....	25
2.4.2	Heparin-Antagonisten	25
2.4.3	Synthetische Inhibitoren.....	26
2.5	Ziele und geplantes Vorgehen	27
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Geräte.....	29
3.2	Chemikalien und Materialien.....	29
3.2.1	Materialien und Substanzen für die Zellkultur und Enzymkinetik	29
3.2.2	Materialien und Substanzen für SDS-PAGE und Western Blot	31
3.2.3	Materialien und Substanzen für die Immunfluoreszenz	31
3.2.4	Antikörper	31
3.2.5	KITs	31
3.3	Puffer	32
3.4	Methoden.....	33
3.4.1	Zellkultur	33
3.4.2	Einfluss von Tryptaseinhibitoren auf HMC-1 Zellen	33
3.4.3	Einfluss von Cathepsin C-Inhibitoren auf HMC-1 Zellen.....	35
3.4.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	36
3.4.5	Gelelektrophorese und Western Blot.....	38
3.4.6	Immunfluoreszenzfärbung	40

4	Ergebnisse.....	43
4.1	Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Quantifizierung von Tryptase in Mastzellen	43
4.1.1	Optimierung der Propagierung der HMC-1 Zelllinie	43
4.1.2	Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Tryptaseaktivität während Kurzzeitkulturen	44
4.1.3	Optimierung der Herstellung von HMC-1 Zelllysaten.....	45
4.1.4	Einfluss des Assay-Substrates	46
4.1.5	Analyse der ‚Tryptaseaktivität‘ im Zelllysate	47
4.1.6	Bestimmung des Tryptasegehalts verschiedener HMC-1 Subzelllinien ..	49
4.2	Anpassung der Methodik an das 96-Well Mikrotiterplatten-Format	52
4.2.1	Vergleich der Methoden.....	53
4.2.2	Validierung von Methoden zur Zelldichte- und Vitalitäts-bestimmung in der Mikrotiterplatte	55
4.3	Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Aktivität der Tryptase in HMC-1 Zellen.....	56
4.3.1	Inkubation von HMC-1 Zellen mit Proteinase-Inhibitoren.....	56
4.3.2	Irreversible Serinproteaseinhibitoren	57
4.3.3	Einfluss reversibler Serinprotease-Inhibitoren.....	59
4.3.4	Nachweis des Tryptaseinhibitors TdPI in HMC-1 Mastzellen.....	63
4.3.5	Einfluss von TdPI auf die immunoreaktive Tryptase	64
4.3.6	Einfluss von Inhibitoren auf die Vitalität und Morphologie von HMC-1 Zellen.....	65
4.4	Einfluss von Benzamidin auf die Tryptaseaktivität in HMC-1 Zellen	66
4.4.1	Toxizität von Benzamidin auf HMC-1 Zellen	67
4.4.2	Einfluss von Benzamidin auf immunoreaktive Tryptase in HMC-1 Zellen.....	68
4.5	Einfluss von Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Aktivität von Cathepsin C und Tryptase β in HMC-1	70
4.5.1	Einfluss von E64 auf die Cathepsin C-Aktivität	70
4.5.2	Einfluss von E64 auf die Tryptaseaktivität	71
4.5.3	Einfluss von HR-57 auf die Cathepsin C-Aktivität	73
4.5.4	Einfluss von HR-57 auf die Tryptaseaktivität	74

5	Diskussion	75
5.1	Etablierung der Methode.....	75
5.1.1	Kultivierung der HMC-1 Zelllinie	75
5.1.2	Herstellung von HMC-1 Zelllysaten	76
5.1.3	Analyse der tryptischen Aktivität im Zelllysate	77
5.1.4	Quantifizierung der Tryptase in HMC-1 Subzelllinien	78
5.1.5	Überführung der Methode auf das 96-Well Mikrotiterplatten-Format	79
5.2	Inhibitorstudien	80
5.2.1	Inhibition der intrazellulären Tryptaseaktivität in HMC-1	80
5.2.2	Toxizität der Inhibitoren.....	82
5.2.3	Einfluss von Benamidin.....	82
5.2.4	Verwendung des Modellsystems zur Charakterisierung von Cathepsin C-Inhibitoren	83
5.2.5	Hypothese zur Lokalisation des Inhibitor-Tryptase Kontaktes	85
5.3	Ausblick	86
	Literaturverzeichnis	89
	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

(pro)-MMP	(pro)-Matrix-Metalloprotease
α 1-PI	α 1-Proteinaseinhibitor
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
DTT	Dithiothreitol
Fus.	Fusionsprotein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor
HDL	High Density Lipoprotein
HMC-1	Humane Mastzelllinie 1
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mMCP-6	Mouse Mast Cell Protease 6
PAR-2	Protease Activated Receptor 2
PHM	Peptide Histidine-Methionine
Pro-NGF	Pro-Nerve Growth Factor
Pro-uPA	Urokinase Type Plasminogen Activator
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted = CCL5
RF	Relative Fluoreszenz
rLDTI	Rekombinanter Leech-derived Tryptase Inhibitor
SM	Systemische Mastozytose
TB	Trypan Blau
TdPI	Tick-derived Proteinase Inhibitor
TEV	Tobacco Etch Virus
TLCK	N α -Tosyl-L-Lysyl-Chlormethanhydrochlorid
TTP	Tryptase-Testpuffer
TVP	Tryptase-Verdünnungspuffer
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VK	Variationskoeffizient

1 Zusammenfassung

Mastzellen sind aus hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammende gewebsständige Effektorzellen mit vielfältigen physiologischen Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunität, die von der Pathogenabwehr bis hin zur Wundheilung reichen. Mastzellen tragen allerdings auch zu einer Vielzahl von allergischen und entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, entzündlichen Darmerkrankungen oder rheumatischen Erkrankungen bei. Daher sind Mastzellen und deren Mediatoren, die entweder präformiert in Granula (z. B. Tryptase, Histamin) vorliegen oder bei der Aktivierung der Mastzelle neu gebildet werden (z. B. Leukotriene, Interleukine), wichtige Zielstrukturen der pharmazeutischen Entwicklung. Seit vielen Jahren werden bei allergischen Erkrankungen Mastzellstabilisatoren, Antihistaminika und Leukotrienrezeptor-Antagonisten mit Erfolg eingesetzt. Ein Fokus bei der Entwicklung neuer Medikamente liegt derzeit auf Tryptaseinhibitoren. Tryptase β , die enzymatisch aktiv in den Mastzellgranula gespeichert vorliegt, wird bei der Degranulation freigesetzt. *In vitro*- und *in vivo*-Studien mit Tryptaseinhibitoren haben gezeigt, dass sie einen vielversprechenden neuen Therapieansatz darstellen. Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob diese Inhibitoren bereits intrazelluläre Tryptase β hemmen und welchen Einfluss sie auf die Mastzellfunktion allgemein haben.

Um den Einfluss von Tryptaseinhibitoren auf die intrazelluläre Tryptase β -Aktivität zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Modell zur Quantifizierung der Tryptaseaktivität mit der humanen Mastzelllinie 1 (HMC-1) etabliert und mit einigen exemplarischen Inhibitoren validiert. HMC-1 Zellen haben eine kurze Verdopplungszeit (48 h) und sind einfach zu kultivieren. In Kurzzeitkulturen ist die Bestimmung der intrazellulären Tryptase gut reproduzierbar ($115 \pm 3 \%$ und $134 \pm 3 \%$ des Ausgangswertes nach 240 bzw. 360 min). Um die Probenanzahl zu erhöhen, wurde das Zellmodell von 48-Well auf 96-Well Mikrotiterplatten umgestellt. Die Variabilität der Ergebnisse nimmt dadurch geringfügig ab (VK 7,6 % bzw. 6,8 %), gleichzeitig sinkt der Materialverbrauch deutlich.

Zur Überprüfung der Eignung der verschiedenen in der Arbeitsgruppe vorhandenen HMC-1 Subzelllinien wurde der Tryptasegehalt der Zellen mittels

Aktivitätsmessungen und Immunoblot bestimmt (0,03 – 1,1 pg/Zelle bzw. 0,12 – 4,2 pg/Zelle). Die Ergebnisse beider Methoden korrelieren gut miteinander, Subzelllinien niedriger Differenzierung besitzen einen geringeren Tryptasegehalt pro Zelle als Subzelllinien höherer Differenzierung. Der immunologisch gemessene Tryptasegehalt liegt deutlich über dem über die Aktivität gemessenen Wert, was auf inaktiv vorliegende Tryptase (z. B. Zymogen, Monomere) in HMC-1 schließen lässt.

Um Effekte von Tryptaseinhibitoren auf die intrazelluläre Tryptaseaktivität mittels des entwickelten HMC-1 Modells zu untersuchen, wurden einige exemplarische Tryptaseinhibitoren verwendet. Sowohl irreversible, synthetische (Pefabloc SC, TLCK, PMSF) als auch reversible, proteinerge Inhibitoren (rLDTI, TdPI, TdPI-Fusionsprotein) hemmen die intrazelluläre Tryptaseaktivität abhängig von Zeit und Konzentration. Die orientierende Morphologie und Granularität der Zellen ist durch die Inhibitoren nicht beeinflusst. Toxische Effekte treten dabei nur in sehr hohen Konzentrationen auf. Die Effektivität der verwendeten Inhibitoren ist v. a. von ihrer Affinität zu Tryptase β und weniger von der molekularen Masse abhängig. Um eine halbmaximale Hemmung zu erzielen, sind jedoch deutlich höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig als zur Inhibition isolierter rekombinanter Tryptase β (z. B. 0,41 μM gegenüber $0,2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ für TdPI). Diese Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Tryptaseaktivität durch Zugabe von Inhibitoren zum Kultivierungsmedium gehemmt werden kann. Die deutlich höheren Inhibitorkonzentrationen, die dafür benötigt werden, sind am ehesten auf die Zellmembran als Diffusionsbarriere zurückzuführen. Der Nachweis eines TdPI-Fusionsproteins in Zelllysaten mittels Immunoblot belegt jedoch, dass die Inhibitoren in die Granula der intakten HMC-1 Zellen gelangen können.

Überraschenderweise zeigt sich bei der Inkubation der HMC-1 Zellen mit dem schnell reversiblen synthetischen Inhibitor Benzamidin keine Inhibition, sondern eine Zunahme der Tryptaseaktivität ($300 \pm 10 \%$ nach 24 h). Diese Ergebnisse lassen einen Feedback-Mechanismus vermuten, der sich in der Zelle als Reaktion auf den Inhibitor abspielt. Inwiefern dies ein für Benzamidin spezifisches Phänomen ist, bleibt zu klären.

2 Einleitung

2.1 Die Mastzelle

Mastzellen sind Gewebszellen hämatopoietischen Ursprungs, die erstmalig 1897 von Paul Ehrlich beschrieben wurden [3, 4]. Eine Mastzelle ist 9 – 12 μm groß, enthält 500 – 1000 elektronendichte, metachromatische Granula

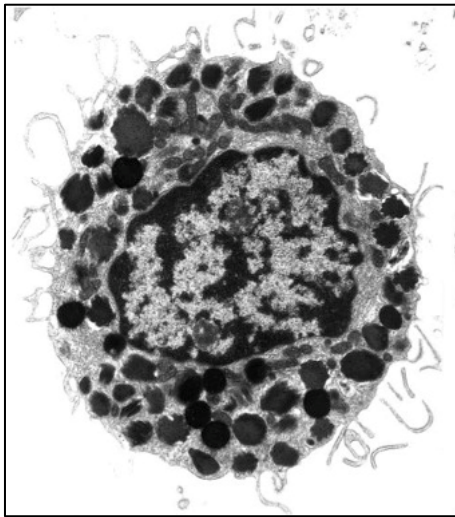


Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Mastzelle [1].

und hat einen relativ großen Zellkern (4 – 7 μm) [5]. Mastzellen sind in allen Organen vorhanden. In hoher Anzahl finden sie sich in Geweben, die die Barriere zur Umwelt darstellen (Haut, Darmschleimhaut, Konjunktiva, etc.). Sie werden aus CD34⁺-Stammzellen im Knochenmark gebildet, als Progenitorzellen in die Blutbahn entlassen und differenzieren im Gewebe aus [6]. Je nach umgebendem Milieu bilden sich verschiedene Phänotypen aus, die sich in ihrem Inhalt an Mediatoren unterscheiden [7, 8].

2.1.1 Physiologie und Pathophysiologie von Mastzellen

Mastzellen sind durch ihre strategische Platzierung an Kontaktflächen und ihrer Vielfalt an Mediatoren und Rezeptoren wichtige Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Wird eine Mastzelle aktiviert, werden je nach Stimulus durch Degranulation präformierte sowie neu synthetisierte Mediatoren ausgeschüttet [9]. Über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren und die Ausschüttung antibiotischer Peptide werden Bakterien, Parasiten und Pilze schnell und effektiv bekämpft. Daneben können Mastzell-Proteasen wie Chymase für den Körper toxische Substanzen wie endogenes Endothelin-1 [10] oder Schlangen- und Insektengifte abbauen [11]. Mastzellen können abhängig von ihrer Umgebung entweder ein proinflammatorisches oder antiinflammatorisches Milieu erzeugen. Wichtige Rollen spielen Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, biogene Amine, Arachidonsäurederivate und Wachstumsfaktoren [12], die alle von Mastzellen produziert werden können. Diese Substanzen wirken auf Leukozyten chemotaktisch (Interleukine, TNF α , Leukotrien B₄) [13], erhöhen die

Kapillarpermeabilität (Histamin) [14] und verursachen Schmerzen (Substanz P, Serotonin) [15]. Sie können aber auch bei chronisch bakteriellen Entzündungen z. B. mit *Mycoplasma pulmonis* [16] oder im Rahmen der Toleranz von Hauttransplantaten [17] die proinflammatorische Immunantwort unterdrücken (u. a. durch IL-10 oder dem Abbau von Zytokinen [18]). In den letzten Jahren wurden weitere, inflammatorisch unabhängige Funktionen von Mastzellen entdeckt. Möglicherweise tragen sie z. B. zur Immuntoleranz oder Wundheilung bei, wenngleich die Relevanz von Mastzellen in diesem physiologischen Kontext noch kontrovers diskutiert wird [19, 20]. Außerdem könnten Mastzellgranula als Grundlage für neue Adjuvantien in Impfstoffen dienen [21].

Pathophysiologisch sind Mastzellen vor allem aufgrund ihrer ursächlichen Rolle bei allergischen Typ I-Hypersensitivitätsreaktionen bekannt geworden. Durch Kontakt eines multivalenten Antigens an IgE-Antikörpern, die an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auf der Mastzelloberfläche gebunden sind, kommt es zu einer Quervernetzung der Rezeptoren. Dadurch wird die Degranulation der Mastzelle ausgelöst. Die Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin, Serotonin oder chemotaktischen Faktoren sowie Proteasen (Trypsin, Chymase) hat die typischen Symptome mit lokalem Pruritus, Schwellung und Bronchokonstriktion bis hin zu einem systemischen anaphylaktischen Schock zur Folge. Andere Stimuli, die zur Degranulation von Mastzellen führen, sind physikalische Faktoren (z. B. hohe Temperatur und mechanische Reize), endogene Faktoren (z. B. über Aktivierung von Rezeptoren) oder Toxine. Bereits seit Langem werden pharmakologische Ansätze im Bereich allergischer Erkrankungen verfolgt, die die Mastzellaktivierung (Chromoglycinsäure) oder die ausgeschütteten Mediatoren (Histamin- oder Leukotrien-Rezeptorantagonisten, Cyclooxygenase-Inhibitoren) hemmen.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Mastzellen ebenfalls an vielen nichtallergisch bedingten Erkrankungen beteiligt sind, oder deren Ausprägung modulieren. Dazu gehören Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, männliche Infertilität, pulmonale Hypertension, Artherosklerose und ischämisches Reperfusionssyndrom des Herzens und Gehirns, interstitielle Zystitis, Tumorerkrankungen und sogar Morbus Alzheimer und Adipositas [22].

2.2 Die HMC-1 Mastzelllinie

Die Mastozytose ist eine seltene Erkrankung, die durch eine (klonale) Vermehrung von Mastzellen in der Haut oder in inneren Organen charakterisiert ist. Zu Grunde liegen in der Regel verschiedene aktivierende Mutationen des c-Kit-Rezeptors. Es wird zwischen der kutanen Mastozytose, die vor allem bei Kindern vorkommt und eine gute Prognose besitzt, und der systemischen Mastozytose unterschieden. Die systemische Mastozytose (SM) ist durch den Befall von mindestens einem extrakutanen Organ charakterisiert und lässt sich laut aktueller WHO-Klassifikation (2016) in weitere Unterformen unterteilen (indolente SM, smoldering SM, SM mit assoziierter Neoplasie, aggressive SM, Mastzell-Leukämie) [23-25].

Ausgehend von einem Patienten mit Mastzell-Leukämie haben J. H. Butterfield *et al.* 1988 die erste humane Mastzell-Zelllinie gewonnen, die noch heute als Modellzelllinie Verwendung findet [26]. Die humane Mastzelllinie 1 (HMC-1) weist im Gegensatz zu ausdifferenzierten Mastzellen eine aktivierende Mutation des c-Kit Rezeptors auf. Dadurch haben HMC-1 Zellen eine hohe Proliferationsrate und können gut kultiviert werden. Im Unterschied zu ausdifferenzierten Mastzellen exprimieren sie allerdings weder den hochaffinen FcεRI-Rezeptor für IgE noch Tryptase α oder Chymase [27]. Die in den Granula enthaltenen Proteasen werden in deutlich geringeren Mengen produziert, Tryptase β ist jedoch auch in HMC-1 ein Hauptbestandteil [28]. Mittlerweile existieren außerdem HMC-1 Unterformen, die durch Klonierung entstanden sind. Sie zeichnen sich durch verschiedene Mutationen im Kit-Rezeptor-Gen und in ihrer spezifischen Rezeptorexpression aus [29-31].

2.3 Mastzellproteasen

Mastzellen exprimieren selektiv eine Reihe von Granula-assoziierten Proteasen, die aktiv in den Granula gespeichert vorliegen und bei der Degranulation in das umliegende Gewebe ausgeschüttet werden.

2.3.1 Mastzelltryptasen

1960 wurde das Vorkommen einer Trypsin-ähnlichen Serinprotease in Mastzellen entdeckt, die heute Tryptase β genannt wird [32]. Tryptasen sind Mastzell-spezifische Proteasen, die in ihrer Entwicklungsgeschichte weit zurückverfolgt und bereits in Amphibien nachgewiesen werden können. Die Struktur und Enzymspezifität zwischen den einzelnen Spezies sind jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt [33].

Die Gene aller humanen Tryptasen liegen zusammen mit denen anderer Serinproteasen auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p13.3: *TPSAB1* (β I- α), *TPSB2* (β II- β III), *TPSD1* (δ), *TPSG1* (γ)). Sie kodieren für die vier Tryptasen α , β , δ und γ , von denen Tryptase β die bedeutendste Rolle beigemessen wird. Die Gene *TPSAB1* und *TPSB2* können in verschiedenen allelischen Varianten vorliegen, die entweder für eine aktive (Tryptase β) oder inaktive (Tryptase α) Tryptase kodieren. Dies führt dazu, dass ca. 30 % der Bevölkerung keine Tryptase α exprimieren [34]. Andererseits haben alle bisher untersuchten Personen mindestens ein Allel, das eine enzymatisch aktive Tryptase β kodiert, was den hohen Stellenwert dieser Protease unterstreicht [35].

Tryptase β

Die allelischen Varianten der Tryptase β , β I, β II und β III, unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig (>99 % Identität). β I- und β III-Tryptase weisen an Position 142 ein Asparagin auf und besitzen zwei Glykosilierungsstellen, β II-Tryptase hingegen nur eine [36].

Viele der ungewöhnlichen Eigenschaften der Tryptase β , die nur in Form eines Tetramers enzymatisch aktiv ist, wurden durch die Aufklärung der Kristallstruktur erklärt. Je vier 33 kDa große Tryptase β Monomere bilden einen flachen Ring, deren katalytische Zentren (Asp188-Gly215-Gly225) zur Mitte hin gerichtet sind. Hierdurch entsteht ein Tetramer mit einer Größe von ca. 140 kDa. Die Eingangspore des Ringes ist verhältnismäßig klein ($40 \times 15 \text{ \AA}^2$), was dazu führt, dass nur kleine Substrate und wenige Inhibitoren an die aktiven Zentren

der Untereinheiten binden können. Die Kontaktflächen zwischen den Monomeren A-B und C-D sind klein (540 \AA^2) und werden hauptsächlich durch hydrophobische Wechselwirkungen zusammengehalten. Im Gegensatz dazu sind die Kontaktflächen zwischen A-D und B-C größer (1075 \AA^2). Sie sind über hydrophobische Wechselwirkungen, vier Wasserstoffbrückenbindungen und eine Ionenbindung verbunden. Die recht schwache Bindung zwischen A-B und C-D wird dadurch ausgeglichen, dass sich hier Bindungsstellen für Heparin oder ähnlicher, negativ geladener Proteoglykane befinden. Diese binden an die dort exponierten Histidin-Reste und stabilisieren dadurch das Tetramer (Abb. 2.2) [37, 38].

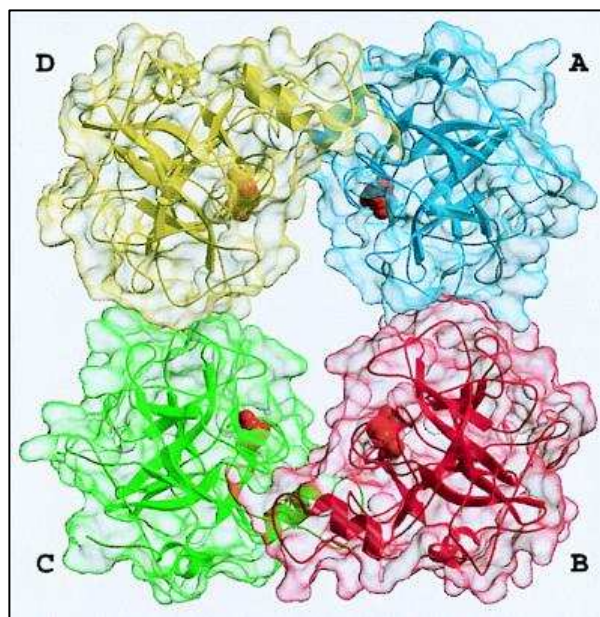


Abb. 2.2: 3D-Struktur der Trypsin β . Der Trypsin β Tetramer besteht aus vier Monomeren, deren aktive Zentren zur zentralen Pore hin gerichtet sind [2].

Trypsin β wird als Zymogen exprimiert, das vor der Speicherung in Mastzell-Granula in einem zweistufigen Prozess aktiviert wird. In einem ersten Schritt wird zwischen Arg⁻³ und Val⁻² das Propeptid durch Autokatalyse gekürzt. Dieser Schritt ist von einem sauren pH-Wert und der Anwesenheit von Heparin abhängig. In einem zweiten, Heparin-unabhängigen Schritt, werden die letzten beiden Aminosäuren des Propeptids durch die Exopeptidase Cathepsin C abgespalten und das reife, inaktive Monomer liegt vor. Die Tetramerbildung und Aktivierung muss nun wieder in der Anwesenheit von Heparin (oder Dextransulfat) und bei saurem pH erfolgen [39]. Alternativ kann Trypsin β direkt

durch die Endopeptidasen Cathepsin L und B aktiviert werden [40, 41], dabei ist kein autokatalytischer Schritt nötig.

Tryptase β macht ca. 25 % des Gesamtproteins einer reifen Mastzelle aus (ca. 30 pg/Zelle). Außer in Mastzellen wird Tryptase β in sehr geringen Mengen in Basophilen exprimiert [42, 43]. Das Enzym liegt bereits als ein durch Heparin stabilisiertes, aktives Tetramer in den Mastzellgranula gespeichert vor. Die höchste enzymatische Aktivität besitzt Tryptase β bei neutralem pH, in den Granula herrscht jedoch ein saures Milieu (pH 5,5). Dadurch wird die enzymatische Aktivität zum Eigenschutz der Zelle bis zur Degranulation unterdrückt. Bei der Degranulation der Mastzelle werden die aktiven Tetramere zusammen mit Heparin und anderen Granulainhalten (z. B. Histamin, andere Proteasen, Chemokine) ausgeschüttet und entfalten im Extrazellulärraum ihre Wirkung. Nach der Degranulation der Mastzelle erfolgt aufgrund des veränderten pH-Wertes und das Abdiffundieren von Heparin eine langsame Destabilisierung des Tetramers und die Dissoziation in enzymatisch weitgehend inaktive Monomere. Diese Dissoziation der Tetramere zu Monomeren im Gewebe ist der wahrscheinlichste Mechanismus zur Deaktivierung der Tryptase *in vivo*, da keine endogenen Inhibitoren für das Tryptase-Tetramer bekannt sind [44].

Tryptase β ist eine neutrale Serinprotease mit Trypsin-ähnlicher Aktivität und spaltet Substrate carboxyterminal von Arginin oder Lysin [45]. Im Gegensatz zum (monomeren) Trypsin spaltet Tryptase β jedoch nur eine limitierte Zahl von Substraten (Tab. 2.1). Zu den sofortigen Auswirkungen von Tryptase zählen zum Beispiel die Steigerung der Kapillarpermeabilität [14, 46] und die Produktion von Bradykinin aus Kininogen [47, 48], was in der Ausbildung von Ödemen resultiert. Tryptase kann Bronchodilatoren wie VIP, PHM und CGRP abbauen, gleichzeitig aber bleiben Bronchokonstriktoren wie Substanz P oder Neurokinin A intakt. Zusätzlich verstärkt Tryptase die konstriktive Wirkung von Histamin an der glatten Bronchialmuskulatur [49]. Außerdem regt sie die Proliferation von Fibroblasten [50, 51], Epithelzellen und glatten Muskelzellen der Bronchien an [52, 53]. Tryptase kann selbst Mastzellen aktivieren [54, 55], aktiviert pro-MMP3 und pro-uPA, die dann weitere MMPs und Plasminogen aktivieren. Sie stimuliert auch die Produktion von Kollagen in Fibroblasten [56, 57]. So greift sie grundlegend in den Ab- und Aufbau von Kollagenen, Elastinen und Proteoglykanen ein und modelliert dadurch die Extrazellulärmatrix. Zudem werden durch Tryptase

Eosinophile [58] und Neutrophile rekrutiert, indem sie die Ausschüttung von Chemokinen wie IL-6, IL-8, GM-CSF und MCP-1 und die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) in Endothel-, Epithel- und glatten Muskelzellen steigert. Dadurch kann Tryptase die Entzündungsreaktion im Gewebe koordinieren [58-60]. Die Aktivierung von Nervenzellen über den Rezeptor PAR-2 führt zu Schmerzen, Juckreiz und einer neurogenen Entzündung, die ebenso Einfluss auf die umgebenden Strukturen nimmt [15]. PAR-2 ist auch auf Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Mastzellen und peripheren Nervenendigungen exprimiert. PAR-2 befindet sich in Organen des Gastrointestinaltraktes, der Luftwege, in der Haut, der Harnblase und im Gehirn [61]. Dass viele der oben genannten Effekte von Tryptase über den Mechanismus der PAR-2 Aktivierung zustande kommen, konnte *in vivo* in Mausmodellen mit PAR-2 Defizienz reproduziert werden [62-66]. Daher könnte PAR-2 das Hauptsubstrat von Tryptase *in vivo* sein.

Auch die Tryptase Monomere können noch eine geringe Aktivität besitzen und größere Proteine wie Fibronectin spalten [67], sind aber im Gegensatz zu den Tetrameren sensibel gegenüber endogenen Inhibitoren wie Antithrombin, Serpin B6 oder α 2-Makroglobulin [68, 69].

Substrat	Referenz	Substrat	Referenz
Kininogen	[47, 48]	Pro-MMP3 (Stromelysin-1)	[70, 71]
Prekallikrein	[72]	Kollagen VI	[73]
Fibrinogen	[74-76]	Prä-Elafin	[77]
Gelatin	[78, 79]	PAR-2	[15, 80-82]
VIP	[83]	Eotaxin	[84]
PHM	[85]	RANTES	[84]
CGRP	[85]	Vasopressin	[86]
Pro-uPA	[87]	Kinetensin	[86]
Fibronectin*	[67]	Komplementfaktor C3*	[88, 89]
HDL	[90]	Pro-NGF	[91]

Tab. 2.1: Übersicht über die Substrate von Tryptase β ; *Spaltung durch Tryptase Monomere.

Die Effekte von Tryptase β wurden insbesondere im Rahmen der Aufklärung der Pathophysiologie des Asthmas, welches mit der typischen Trias Bronchokonstriktion, chronischer Entzündung und Umbau des umgebenden Gewebes einhergeht, untersucht. Der Beitrag von Tryptase β zur gesteigerten

bronchialen Konstriktion und Irritation sowie den Langzeit-Schäden im Bronchialsystem (s. o.) ist relativ gut belegt [92, 93]. Teilweise wurden die Ergebnisse jedoch mit der in der Maus vorkommenden Tryptase mMCP-6 oder mit Tryptase anderer Spezies produziert, z. B. *in vivo* an Schafen mit allergischem Asthma [94, 95], sodass die Übertragbarkeit auf humane Tryptase im Speziellen noch genauer überprüft werden muss.

Tryptase β ist auch in anderen entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung. So vermittelt sie in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Steigerung der Darmpermeabilität und die Aufhebung der Barrierefunktion des Darmes [96-98]. In Psoriasis-Läsionen spielt sie u. a. eine kritische Rolle in der Rekrutierung von Lymphozyten [99]. Weiterhin greift sie in Prozesse der Angiogenese und Tumorzellproliferation [100-103] sowie von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen ein [90, 104]. Mittlerweile gibt es erste Hinweise auf intrazelluläre Funktionen von Tryptase β . So wurde nachgewiesen, dass Tryptase β zur Zellhomöostase beiträgt, indem sie mit Histonen des Zellkerns interagieren kann [105].

Tryptase β -Level im Blut sind mittlerweile im klinischen Alltag ein wichtiger Marker zur Diagnose von anaphylaktischen Reaktionen oder beim Follow-up von Mastzellaktivierungssyndromen [106, 107].

Tryptase α , γ und δ

Im Vergleich zu Tryptase β sind die Tryptasen α , γ und δ weniger gut untersucht. Phylogenetisch besitzen sie und Tryptase β den gleichen Ursprung und ähneln sich in ihrer Primär- und Sekundärstruktur. **Tryptase α** ist durch den Aminosäureaustausch G216D gekennzeichnet, durch den die Aktivität im Vergleich zu Tryptase β um ein Vielfaches vermindert wird. Ein weiterer Austausch im Propeptid verhindert die Aktivierung des Enzyms durch Cathepsin C. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass das α -Zymogen *in vivo* nicht aktiviert wird. *In vitro* kann Tryptase α Tetramere bilden, die strukturell denen der Tryptase β sehr ähnlich, aber enzymatisch inaktiv sind [108].

Tryptase δ besitzt, neben einer Mutation im Propeptid analog der Tryptase α , ein vorzeitiges Stoppcodon, sodass abgesehen von der fraglichen Aktivierung eine C-terminal verkürzte Tryptase entsteht. Tryptase δ liegt *in vitro* als Monomer vor, das keine oder nur sehr geringe Aktivität hat; *in vivo* wurde die Expression in Mastzellen bestätigt, die Funktion ist jedoch unklar [109, 110].

Tryptase γ ist die phylogenetisch älteste Tryptase und weicht in Struktur und Affinität deutlicher von den anderen Tryptasen ab. Tryptase γ zeichnet sich durch eine C-terminale hydrophobe Domäne aus, die als Transmembrandomäne fungieren könnte; somit ist Tryptase γ die einzige membranständige Tryptase. Während der Mastzell-Degranulation wird sie vom Inneren der Granula an die Oberfläche der Zellen transloziert. Tryptase γ besitzt ein von Tryptase β abweichendes Substrat- und Inhibitionsspektrum, sodass davon ausgegangen wird, dass beide Enzyme *in vivo* unterschiedliche Aufgaben besitzen. Bisher wurde nachgewiesen, dass Tryptase γ inflammatorisches Potential besitzt, eventuell für von Tryptase β unabhängige Effekte beim Asthma verantwortlich ist und in der Pathophysiologie von COPD und akuter Kolitis eine Rolle spielen könnte [111-114].

2.3.2 Cathepsin C

Cathepsin C, auch Dipeptidylpeptidase I genannt, ist eine Cysteinprotease der Papainfamilie, die in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert wird. Cathepsin C liegt als Tetramer vor und agiert bei saurem pH als vergleichsweise unspezifische Exopeptidase, die jeweils ein Dipeptid N-terminal an Proteinen abspaltet [115]. Physiologischerweise ist sie Granula- und Lysosomen-assoziiert und hat intrazelluläre Funktionen z. B. beim Abbau von Proteinen in Lysosomen und der Aktivierung von Proteasen. Zu den Enzymen, die von Cathepsin C aktiviert werden können, gehören die Zymogene der Granzyme A, B und K in zytotoxischen T- und natürlichen Killer-Zellen, Pro-Cathepsin G, Pro-Elastase und Pro-Proteinase 3 in Neutrophilen, sowie Pro-Chymase und Pro-Tryptase in Mastzellen [39, 116-118]. Über Mausmodelle mit Knock-out des Cathepsin C Gens (DPPI^{-/-}) konnten die Effekte von Cathepsin C und die Auswirkungen auf die von ihr aktivierten Proteasen studiert werden. So ist die Aktivität von Elastase, Proteinase 3, und Cathepsin G in den Neutrophilen dieser Mäuse stark reduziert, die Tryptaseaktivität in Mastzellen wird um ca. 50 – 75 % vermindert. Weiterhin konnte in den Knock-out Mäusen keine Chymaseaktivität detektiert werden [118]; allerdings berichten Sheth *et al.*, dass ein Cathepsin C-Inhibitor keinen Effekt auf die Chymaseaktivität in HMC-1 im Vergleich zur Kontrolle hat [43], während andere davon ausgehen, dass Chymase in diesen Zellen nicht exprimiert wird [27]. DPPI^{-/-} Mäuse entwickeln

weniger oft abdominale Aortenaneurysmen, Arteriosklerose [119, 120] oder akute Arthritis [117]. Außerdem besitzen sie eine bessere Überlebensrate nach experimentell induzierter Sepsis [121].

Mutationen des humanen Cathepsin C Gens, die in einem Verlust der Cathepsin C Aktivität resultieren, führen zu zwei seltenen Erkrankungen, den Papillon-Levèvre und Haim-Munk Syndromen. Patienten mit dem autosomal rezessiv vererbten Papillon-Lefèvre Syndrom präsentieren sich mit einer palmo-plantaren Keratose und aggressiver Peridontitis, die oft den Verlust des Gebisses bereits im Jugendalter zur Folge hat. 20 % der Patienten besitzen ebenfalls eine Neigung zu bakteriellen Infekten. Es wird angenommen, dass die stark verminderte Aktivierung und Stabilität der Serinproteasen in neutrophilen Granulozyten ursächlich dafür ist [122, 123].

Cathepsin C-Inhibitoren sind schon seit längerem in Entwicklung, da sie bei Krankheiten mit absolutem oder relativem Überschuss der oben genannten Proteasen zur Unterdrückung des Immunsystems in inflammatorischen Prozessen, wie akuten und chronischen Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen, wirkungsvoll sein könnten [119, 124, 125]. Bislang liegen allerdings noch keine klinischen Studien vor.

2.3.3 Weitere Mastzellproteasen

Neben den Tryptasen exprimieren Mastzellen zwei weitere Proteasen, Chymase und Carboxypeptidase A3, die präformiert in Granula gespeichert sind. Humane Chymase besitzt ein chymotryptisches Aktivitäts- bzw. Substratspektrum. Im Gegensatz zu Tryptase kann sie durch endogene Inhibitoren, wie Serpine oder α 2-Makroglobulin, gehemmt werden. Physiologischerweise trägt Chymase zur Abwehr von Parasiten, Bakterien und Toxinen bei, kann Allergene spalten (z. B. Profilin) [126], und ist ein wichtiger Regulator des Auf- und Abbaus der Extrazellulärmatrix [127, 128]. Chymase ist wesentlich bei der Produktion von Angiotensin II aus Angiotensin I und greift damit in die Blutdruckregulation ein. Langfristig kann Chymase so zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, Arteriosklerose und pulmonaler Hypertonie beitragen [129-131].

Carboxypeptidase A3 ist eine Zink-abhängige Metallo-Exopeptidase, die ebenfalls enzymatisch aktiv in den Granula gespeichert ist. Sie scheint im Komplex mit Chymase und Proteoglykanen sezerniert zu werden [132]. Zu den

Funktionen von Carboxypeptidase A3 zählen die Inaktivierung endogener, potenziell letaler Peptide wie Neurotensin und Endothelin [10, 133, 134], sowie die Inaktivierung von einigen Schlangengiften [10, 11]. Bei Patienten mit Asthma wurde eine vermehrte Expression nachgewiesen, die Rolle in diesem Krankheitsbild ist allerdings noch ungeklärt [135].

2.4 Inhibitoren von Tryptase β

2.4.1 LDTI und TDPI

Im Gegensatz zu nahezu allen anderen Proteasen wird Tryptase β durch endogene Inhibitoren im Blut und Gewebe nicht gehemmt. Bislang wurden lediglich zwei natürliche Inhibitoren entdeckt, Leech derived Tryptase Inhibitor (LdTI) und Tick derived Protease Inhibitor (TdPI).

LDTI wurde 1994 aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert und gehört zu den atypischen Kazal-Typ Inhibitoren [136]. LDTI hemmt aus sterischen Gründen höchstens 50 % der Tryptaseaktivität ($K_i = 1,4 \text{ nM}$); das Protein ist mit 46 Aminosäuren zu groß, sodass maximal zwei LDTI Moleküle in die zentrale Pore des Tryptase-Tetramers passen. Dadurch werden zwei der vier aktiven Zentren nicht besetzt und bleiben aktiv [137-139].

TdPI ist ein modifizierter Kunitz-Typ Inhibitor, der 2007 aus den Speicheldrüsen adulter Zecken isoliert wurde. Er hemmt aus sterischen Gründen $\leq 75 \%$ der Tryptaseaktivität; zwei TdPI-Moleküle blockieren dabei drei der vier aktiven Zentren. Um den Wirkungsmechanismus von TdPI zu untersuchen, wurde eine N- und C-terminal verkürzte Version des Inhibitors (TdPI short) rekombinant hergestellt, die aus der inhibitorischen Kunitz-Domäne besteht. Diese Variante besitzt für Trypsin das gleiche inhibitorische Potential ($K_i = 0,3 \text{ nM}$), während Tryptase β durch TdPI short wesentlich schlechter als durch TdPI ($K_i = 1300 \text{ nM}$ bzw. $0,02 \text{ nM}$) inhibiert wird [140, 141].

2.4.2 Heparin-Antagonisten

Heparin-Antagonisten können die Aktivität der Tryptase β reduzieren, indem sie mit dem Protein um Heparin konkurrieren. Der Tryptasetetramer ist ohne die Bindung an Heparin nicht stabil und dissoziiert in Monomere, die keine oder nur geringe Aktivität besitzen. Beispiele für Heparin-Antagonisten sind Antithrombin und polykationische Peptide wie Protamin und Lactoferrin.

Für Lactoferrin konnte gezeigt werden, dass es die Bronchokonstriktion der späten Phase und die bronchiale Hyperreaktivität in Schafen mit allergischem Asthma vermindert [142, 143]. Protamin mildert in Ratten die Auswirkungen von einem intestinalen Ischämie-Reperfusionssyndrom ab [144].

2.4.3 Synthetische Inhibitoren

Da Tryptaseinhibitoren potenziell zur Therapie von Mastzell-assoziierten Erkrankungen wie z. B. dem Asthma eingesetzt werden können, wurde eine Vielzahl von strukturell sehr unterschiedlichen synthetischen Inhibitoren hergestellt. Bei der Entwicklung in Richtung klinischer Anwendung stellen neben den pharmakologischen Eigenschaften die Affinität gegenüber Tryptase und die Selektivität gegenüber verwandten Trypsin-ähnlichen Serinproteasen wie Trypsin und Thrombin große Probleme dar (für Review siehe [42, 145]).

Trotz der vergleichsweise diversen Inhibitoren wurden bislang nur wenige Studien publiziert, in denen Tryptaseinhibitoren im Tiermodell oder in klinischen Studien *in vivo* eingesetzt wurden. Vergleichsweise gut charakterisiert ist APC-366, ein unselektiver kanonischer Inhibitor mit niedriger molekularer Masse, der in Asthamamodellen im Schaf und im Schwein sowohl die frühe als auch die späte Bronchokonstriktion, die bronchiale Hyperreaktivität und die Eosinophileninfiltration im Gewebe vermindert [146, 147]. Ähnliche Effekte hat BABIM, ein Zink-abhängiger Tryptaseinhibitor [146]. Auch MOL 6131 reduziert Bronchokonstriktion, Hyperreaktivität, Eosinophileninfiltration, Becherzellzahl und peribronchiale Ödembildung in Mäusen [148].

Neben den monomeren Tryptaseinhibitoren sind bivalente Inhibitoren interessante Ansatzpunkte, da sie eine sehr hohe Affinität zu Tryptase und eine bessere Selektivität gegenüber Trypsin haben [149-151]. AMG-126737, ein solcher bivalenter, kationischer Inhibitor, reduziert in Meerschweinchen die frühe und späte Bronchokonstriktion und die bronchiale Hyperreaktivität [152].

Klinische Studien wurden bisher mit APC-366 und APC-2059 publiziert. APC-366 reduziert in Patienten mit Asthma die späte bronchiale Obstruktion signifikant. APC-2059 führte in einer Phase II-Studie mit Patienten mit einer milden bis moderaten Colitis ulcerosa bei 30 % der Patienten zur Remission und verbesserte bei 50 % der Patienten die Symptome deutlich [97, 153]. Die weitere Entwicklung dieser Inhibitoren wurde jedoch eingestellt.

2.5 Ziele und geplantes Vorgehen

Tryptase β ist enzymatisch aktiv in Mastzellgranula gespeichert. Obwohl Tryptaseinhibitoren bereits in Tiermodellen und klinischen Studien eingesetzt wurden ist bisher unklar, ob Tryptase β nur extrazellulär nach der Freisetzung durch Mastzell-Degranulation oder bereits intrazellulär gehemmt werden kann und welche Auswirkungen eine Hemmung auf Mastzellen hat. Für TdPI gibt es Hinweise, dass es in Mastzellgranula gelangt [141], unklar ist hierbei, ob die Tryptaseaktivität bereits intrazellulär in den Granula gehemmt wird. In dieser Arbeit sollte deshalb zunächst ein Modell zur Bestimmung der intrazellulären Tryptaseaktivität entwickelt werden. Mit der Methode sollte dann an verschiedenen, beispielhaften Inhibitoren die Frage geklärt werden, ob Inhibitoren in den Granula gespeicherte Tryptase β hemmen können. Außerdem sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine intrazelluläre Tryptasehemmung auf die Zelle (z. B. Morphologie, Toxizität) und auf die Tryptasemenge besitzt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob das Modell zur Charakterisierung von Cathepsin C-Inhibitoren geeignet ist.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Zentrifugen	
Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Rotofix 32 mit Zyto-Rotor	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Mikroskope	
Olympus IMT-2	Olympus, Hamburg
Zeiss Axioskop	Zeiss, Oberkochen
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
CASY 1 Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Sicherheitswerkbank SterilCard	The Baker Company, Sanford, USA
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Wasserbad WB 350	Memmert, Schwabach
Bio Assay Reader HTS 7000	PerkinElmer, Waltham, USA
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson, Danbury, USA
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Life Techn., Darmstadt
Elektrophoresesystem	
Pierce Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Scientific, Schwerte
BluePower 500 Netzgerät	Serva, Heidelberg
Canon EOS 60D Spiegelreflexkamera	Canon, Krefeld

3.2 Chemikalien und Materialien

3.2.1 Materialien und Substanzen für die Zellkultur und Enzymkinetik

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Humane Mastzelllinie HMC-1 und Subtypen	Dr. J. H. Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, USA und AG Sommerhoff
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Foetales bovines Serum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PBS Dulbecco	Merck, Darmstadt
Heparin aus boviner intest. Mucosa, H-0777	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Multiwellplatte, flacher Boden, 48- und 96-Well	BD Biosciences, Erembodegen, Belgien
Multiwellplatte, V-Boden, 96-Well	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Reigate, UK

Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Rekombinante Trypsin β	AG Sommerhoff
Cathepsin C	Boehringer Ingelheim, Ingelheim/ Rhein
Thrombin aus humanem Plasma, T-6884	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I, RNase frei, 99182-3	Novagen, Merck, Darmstadt

Substrate und Standard

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
tos-GPR-AMC, I-1365	Bachem, Bubendorf, Schweiz
tos-GPK-AMC, I-1370	Bachem, Bubendorf, Schweiz
H-GR-AMC, I-1215	Bachem, Bubendorf, Schweiz
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Inhibitoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
1,10-Phenanthrolin, 32010	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Antithrombin III aus bovinem Plasma, A9141	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin aus boviner Lunge, A4529	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzamidin Hydrochlorid, B-6506	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E64, E-3132	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA, E-4884	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hirudin	Serva, Electrophoresis, Heidelberg
N α -Tosyl-L-Lysyl-chlormethanhydrochlorid (TLCK), 24648	Merck, Darmstadt
Pefabloc-SC, 1429876	Roche, Rotkreuz
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), P7626	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α 1-Proteinaseinhibitor, A9024	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Byk 296172	AG Sommerhoff
E64c	N. Schaschke, Universität Aalen
HR-57	N. Schaschke, Universität Aalen
NS222	N. Schaschke, Universität Aalen
rLdTI	AG Sommerhoff
rTdPI	AG Sommerhoff
Thioredoxin-His ₆ -TdPI Fusionsprotein	AG Sommerhoff
TdPI-short (Lys21-Gly75 des TdPI, Asp N-terminal hinzugefügt)	AG Sommerhoff
Thioredoxin-His ₆ -TdPI-short Fusionsprotein	AG Sommerhoff

3.2.2 Materialien und Substanzen für SDS-PAGE und Western Blot

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
1,2-1,5 mm Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel
BioTrace PVDF-Membran, 0,45 µm	Pall, Pensacola, USA
High Performance Chemiluminescence Film	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Kodak processing chemicals for autoradiography	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magic Mark XP Western Protein Standard	Novex, Life Technologies, Darmstadt
Pierce Blue Protein Molecular Weight Marker Mix	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer, 10X	Thermo Scientific, Schwerte
ProGel Tris-Glycin 4-20 % 1.0 mm Gradientengel, 12 Bahnen	Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
Tris-Glycin SDS Laufpuffer, 10X	Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau

3.2.3 Materialien und Substanzen für die Immunfluoreszenz

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Menzel-Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific, Schwerte
Zyto-System für RotoFix 32	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

3.2.4 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG, A11034	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Kaninchen anti-Tryptase β IgG	AG Sommerhoff
Kaninchen anti-Ziege IgG, 305-035-008	Dianova, Hamburg
Maus anti-His ₆ -HRP IgG, monoclonal	Roche, Rotkreuz
Ziege anti-Aktin IgG, sc-1616	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen IgG, 111-035-045	Dianova, Hamburg

3.2.5 KITs

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)	PromoKine, Heidelberg
LDH Cytotoxicity Kit II	PromoKine, Heidelberg
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, Schwerte
VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories Inc., USA

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Substanzen wurden in handelsüblicher Qualität von den Firmen Braun, Roth, Merck, Roche, Serva und Sigma-Aldrich bezogen.

3.3 Puffer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Lysepuffer 1	50 mM MES, 300 mM NaCl, 0,01 % Azid, 0,05 % Tween 20, 50 µg/ml Heparin, pH 6
Lysepuffer 2	50 mM MES, 300 mM NaCl, 50 µg/ml Heparin, pH 6
Lysepuffer 3	50 mM MES, 1 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 6
Lysepuffer 4	50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6
Lysepuffer 5	50 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 50 µg/ml Heparin, pH 7,6
Lysepuffer 6	50 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 50 µg/ml Heparin, pH 7,6
Lysepuffer 7	50 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,6
Lysepuffer 8	50 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl, pH 7,6
PBST	PBS, 0,05 % Tween 20
Tris-Glycin Probenpuffer, 2X, (reduzierend)	0,2 M TRIS-HCl, 10 % Glyzerin, 4 % SDS, ca. 0,5 µg Bromphenolblau, 0,2 M DTT, pH 6,8
Tris-Glycin Probenpuffer, 4X	0,4 M TRIS-HCl, 20 % Glyzerin, 8 % SDS, ca. 1 µg Bromphenolblau, pH 6,8
Tryptase-Testpuffer (TTP)	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,01 % Azid, 0,01 % Triton X-100, pH 7,6
Tryptase-Verdünnungspuffer (TVP)	10 mM MES, 1 M NaCl, 0,01 % Azid, 0,01 % Triton X-100, pH 6,1
TTP50	TTP, 50 µg/ml Heparin
Cathepsin C Testpuffer	25 mM MES, 50 mM NaCl, 0,01 % Azid, 0,01 % Brij, 5 mM DTT, pH 6

Mit Ausnahme der Probenpuffer wurden alle verwendeten Puffer vor Zugabe von Detergenz, Heparin oder DTT durch eine 0,2 µm Filtereinheit steril filtriert.

3.4 Methoden

3.4.1 Zellkultur

Alle Zellkultur-Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Für die Zellkultur verwendete Nährmedien und Lösungen wurden – wenn nicht anders beschrieben – vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Zellkultivierung

Die humane Mastzelllinie HMC-1 wurde in IMD-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1,2 mM Monothioglycerol unter sterilen Bedingungen in einem CO₂-Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Die Stammkultur wurde 1 – 2-mal pro Woche passagiert. Zunächst wurde ein Aliquot (30 µl) der Zellsuspension in 6 ml Casyton-Messflüssigkeit überführt und die Zelldichte mit dem CASY 1 Zellzählgerät (Schärfe System) gemessen. Dann wurde ein Teil der Zellsuspension aus der Stammkultur entnommen und die Dichte durch Verdünnung mit frischem Medium in einer neuen 75 cm² Flasche auf $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde bis zu einer maximalen Dichte von etwa 1×10^6 Zellen pro ml kultiviert, die nach ca. sieben Tagen erreicht wurde.

3.4.2 Einfluss von Tryptaseinhibitoren auf HMC-1 Zellen

Inkubation der HMC-1 Zellen mit Tryptaseinhibitoren

Um den Einfluss von Tryptaseinhibitoren auf HMC-1 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in einer 48-Wellplatte mit flachem Boden über bis zu 24 h mit den Substanzen inkubiert. Dafür wurde ein zuvor berechnetes Volumen mit der benötigten Zellzahl aus der Stammkultur entnommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (191 x g, 5 min, 37 °C) und das Zellpellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert. Dann wurden je 250 µl der Zellsuspension (4×10^6 Zellen pro ml, i. e. 1×10^6 Zellen pro Well) auf die Wells verteilt; zuvor war je 250 µl Inhibitor (mit zweifacher Endkonzentration) in Kultivierungsmedium vorgelegt worden. Der Versuchsansatz wurde dann in der 48-Wellplatte im CO₂-Inkubator inkubiert. An den Zeitpunkten $t = 0, 5, 60, 240, 360$ min, 9 h, 24 h wurden je 425 µl Probe entnommen, Zelllysate hergestellt und die Tryptaseaktivität gemessen (s. 3.4.4). Nach 6 h bzw. 24 h wurden zusätzlich Zellen zur

Vitalitätsbestimmung mit Trypan Blau entnommen, nach 24 h wurde die Zellzahl mit dem Casy-Zellzählgerät bestimmt.

Herstellung des Zelllysats

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden 425 µl pro Well (Gesamtvolumen 500 µl) aus dem Versuchsansatz zu den o. g. Zeitpunkten entnommen. Die Proben wurden mit einer Eppendorf-Pipette in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (5 min, 900 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,5 ml PBS (4°C) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Um das Zellpellet vollständig vom Überstand zu befreien wurde die restliche Flüssigkeit vom Rand des Reaktionsgefäßes mit einem Präzisionswischtuch entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet in 85 µl Lysepuffer 1 aufgenommen. Die Proben wurden dreimal in Folge auf Trockeneis (–80 °C) gefroren und im 37 °C warmen Wasserbad getaut, dann bei 4 °C für dreimal 2 s mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Proben mit 20 U DNase I (Novagen) pro 100 µl Probe für 10 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert (5 min, 14.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurzfristig bei 4 °C bis zur Verwendung im enzymatischen Aktivitätstest (s. 3.4.4) gelagert.

Zelllysate für andere Versuche wurden analog hergestellt. Ggf. wurde zuvor die Zelldichte der Kultur bestimmt und das benötigte Volumen der Zellsuspension oder das Volumen des Lysepuffers angepasst, um eine Dichte von mindestens 10.000 bis maximal 20.000 Zellen pro µl Lysepuffer zu erhalten. Die weiteren Präparationsschritte waren identisch.

Bestimmung der Zellvitalität mit Trypan Blau

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der Farbstoff Trypan Blau verwendet, der als nicht membrangängiger Farbstoff nur tote Zellen anfärbt. Dafür wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl 0,4 % Trypan Blau-Lösung in einem 1,5-ml Reaktionsgefäß gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µl wurden in eine Neubauer Zählkammer eingebracht und die Gesamtzellzahl sowie die Zellzahl der blau angefärbten, toten Zellen in den vier großen Eckquadranten ausgezählt. Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$100 - \left(\frac{\text{Anzahl der toten Zellen}}{\text{Anzahl der gesamten Zellen}} \times 100 \right) = \text{Vitale Zellen [\%]}$$

3.4.3 Einfluss von Cathepsin C-Inhibitoren auf HMC-1 Zellen

Inkubation der HMC-1 Zellen mit Cathepsin C-Inhibitoren

Um den Einfluss von Cathepsin C-Inhibitoren auf HMC-1 Zellen zu untersuchen, wurde die unter 3.4.2 beschriebene Methode modifiziert. Die HMC-1 Zellen wurden in einer 96-Wellplatte mit flachem Boden über 48 h mit den Substanzen inkubiert. Es wurden je 150 µl der Zellsuspension ($6,6 \times 10^5$ Zellen pro ml, i. e. $9,9 \times 10^4$ Zellen pro Well) auf die Wells verteilt; zuvor war je 150 µl Inhibitor (zweifach konzentriert) in Kultivierungsmedium vorgelegt worden. Jede Bedingung wurde in Triplikaten angefertigt.

An den Zeitpunkten $t = 0, 6, 24, 30, 48$ h der Inkubation im CO_2 -Inkubator wurden je 150 µl Probe entnommen, Zelllysate hergestellt und die Cathepsin C- und Tryptaseaktivität gemessen (s. 3.4.4). Nach 24 und 48 h wurden zusätzliche Proben zur Bestimmung der Zellzahl mittels Casy-Zellzählgerät (30 µl) bzw. dem WST-8 Proliferationsassay (50 µl) sowie der Toxizität mittels Trypan Blau (10 µl) entnommen. Alternativ wurde die LDH-Aktivität mittels des 'LDH Cytotoxicity Kit II' von PromoKine im Überstand (10 µl) bestimmt (s. u.).

Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden zu den definierten Zeitpunkten 150 µl der Proben mit Hilfe einer Multiwell-Pipette in eine 96-V-Wellplatte überführt und zentrifugiert (5 min, $398 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde zur späteren Messung der LDH-Aktivität aufbewahrt. Die Zellen wurden zweimal mit 150 µl PBS (4°C) gewaschen, nach der letzten Zentrifugation mit 100 µl Lysepuffer 1 lysiert und in einer neuen 96-V-Wellplatte überführt und bei -20°C gelagert.

Wenn alle Lysate desselben Experiments in dieser Platte gesammelt waren, wurden die Proben zur vollständigen Zelllyse dreimal auf Trockeneis gefroren und getaut, kurz auf einem Vortexer durchmischt und zentrifugiert (5 min, $2260 \times g$, 4°C). Die Lysate wurden in eine neue 96-V-Wellplatte überführt und kurzfristig bei 4°C bis zum Einsatz im enzymatischen Aktivitätstest gelagert (s. 3.4.4).

Bestimmung der Proliferation

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde neben dem Casy-Zellzählgerät das 'Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)' von PromoKine verwendet. Dieses Kit

hat gegenüber dem Casy-Zellzählgerät den Vorteil, dass die Bestimmungen nicht einzeln und sequenziell durchgeführt werden müssen, sondern dass 96 Bestimmungen in einer 96-Wellplatte gleichzeitig durchgeführt werden. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden 50 µl sorgfältig gemischte Zellsuspension zu 50 µl PBS hinzugefügt, mit 10 µl Reagenz für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Bio Assay Reader HTS 7000 (PerkinElmer) photometrisch bei einer Absorption von $\lambda_{\text{Abs}} = 485 \text{ nm}$ ausgewertet. Als Standard für die Berechnung der Zellzahl wurden zwei Verdünnungsreihen mit einer Ausgangszellzahl von 2×10^6 und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml verwendet. Über diese Verdünnungsreihen wurde eine Kalibrierungskurve erstellt und die Zellzahl in den Proben mit Hilfe der erhaltenen Kalibrierungskurve berechnet.

Bestimmung der Zytotoxizität durch LDH-Aktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden neben den Färbungen mit Trypan Blau (s. 3.4.2) auch LDH-Aktivitätsmessungen im Überstand eingesetzt. Dafür wurde das 'LDH Cytotoxicity Kit II' von PromoKine verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden im HTS 7000 bei einer Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\text{Abs}} = 485 \text{ nm}$ und einer Referenz von $\lambda_{\text{Em}} = 590 \text{ nm}$ photometrisch ausgewertet. Die Zytotoxizität wurde wie folgt bestimmt:

$$\frac{\text{Testprobe} - \text{minimaler Kontrollwert}}{\text{maximaler Kontrollwert} - \text{minimaler Kontrollwert}} \times 100 = \text{Zytotoxizität [\%]}$$

3.4.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der Proteasen Trypsin β , Cathepsin C und Thrombin wurden fluorogene Peptid-Aminomethylcoumarin (AMC)-Substrate verwendet. Durch Spaltung des Substrats (S) durch das Enzym (E) wird das fluoreszierende AMC (P) freigesetzt:



Zur Bestimmung der Aktivität rekombinanter Enzyme und von Proteasen in Zelllysaten wurde der Testpuffer und das Enzym (in Testpuffer, 4 x konzentriert) bzw. das Zelllysate in 96-Well Mikrotiterplatten vorgelegt (Tab. 3.1). Die Platte wurde ca. 2 min bei 37 °C im Bio Assay Reader temperiert, anschließend wurde das Substrat (4 x konz.) hinzugefügt. Versuchsansätze ohne Enzym, ohne Zelllysate und ohne Substrat und eine AMC-Verdünnungsreihe

wurden auf jeder Platte als Kontrollen mitgeführt. Nach Zugabe des Substrats wurde die Messung sofort gestartet und 40 Zyklen (13 min) gemessen. Die Messungen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden am Bio Assay Reader HTS 7000 (PerkinElmer) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 360 \text{ nm}$ und Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 465 \text{ nm}$ in 96-Well Mikrotiterplatten bei 37 °C durchgeführt.

Der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung des Substrats. Somit ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur enzymatischen Aktivität, die in der relativen Maßeinheit RF/min angegeben wird.

Testpuffer	Enzym/Probe	Substrat
100 μl TTP50	50 μl rekombinante Tryptase β TTP50 200 pM	50 μl tos-GPR-AMC bzw. tos- GPK-AMC in TTP50 20 μM
100 μl TTP	50 μl rekombinantes Thrombin in TTP 50 pM	50 μl tos-GPR-AMC in TTP 20 μM
135 μl TTP50	15 μl Zelllysate $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml	50 μl tos-GPR-AMC bzw. tos- GPK-AMC in TTP50 20 μM
130 μl TTP50	20 μl Zelllysate $\sim 5,0 \times 10^4$ Zellen/ml	50 μl tos-GPR-AMC 10 μM
130 μl Cathepsin C Messpuffer	20 μl Zelllysate $\sim 5,0 \times 10^4$ Zellen/ml	50 μl H-GR-AMC 10 μM

Tab. 3.1: Pipettierschemata für die Messung der enzymatischen Aktivität. Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Test angegeben.

Für hemmkinetische Messungen wurden Versuchsansätze mit Testpuffer, Inhibitor (4 x konz.) und Enzym (4 x konz.) bzw. Zelllysate für 60 min bei 37 °C in der 96-Well Mikrotiterplatte vorinkubiert, dann das Substrat (4 x konz.) hinzugefügt und die Aktivität anschließend sofort gemessen (Tab. 3.2).

Testpuffer	Inhibitor	Enzym/Probe	Substrat
50 µl TTP50	50 µl Inhibitor in TTP50 1 x konz.	50 µl rek. Tryptase β in TTP50 200 pM	50 µl tos-GPR-AMC in TTP50 20 µM
50 µl TTP	50 µl Inhibitor in TTP 1 x konz.	50 µl rek. Thrombin in TTP 50 pM	50 µl tos-GPR-AMC in TTP 20 µM
85 µl TTP50	50 µl Inhibitor in TTP50 1 x konz.	15 µl Zelllysate 7,5 x 10 ⁶ Zellen/ml	50 µl tos-GPR-AMC in TTP50 20 µM

Tab. 3.2: Pipettierschemata für die hemmkinetischen Messungen. Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Test angegeben.

3.4.5 Gelelektrophorese und Western Blot

Vorbereitung von Proben für die SDS-PAGE

Zur Herstellung von SDS-Gelproben wurden Zelllysate (20.000 Zellen pro µl Lysepuffer), Zelllysate aus Inkubationsversuchen mit Tryptaseinhibitoren (s. 3.4.2) oder rekombinante Tryptase β im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt, dem zuvor DTT für reduzierende Bedingungen zugesetzt worden war. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C denaturiert und nach dem Abkühlen 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 4 – 20 % Tris/Glycin-Gradientengelen (Anamed) verwendet. Die Zelllysate (insgesamt 25.000 – 200.000 Zellen, 20 µl) und Kontrollen (20 µl) wurden wie oben beschrieben vorbereitet und in die Geltaschen überführt. Als Größenstandard wurden der 'Pierce Blue Protein Molecular Weight Marker Mix' und 'Magic Mark XP Western Protein Standard' (je 5 µl), als Mengenkontrolle rekombinante Tryptase β (10, 20 oder 50 ng) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der Elektrophoresekammer (Invitrogen) in Tris/Glycin SDS Laufpuffer bei 225 Volt für

ca. 45 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer entnommen und 10 min in ddH₂O gewaschen.

Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde ein Western Blot mit Hilfe des Pierce Fast Semi-Dry Blotters angefertigt. Das nach der Elektrophorese gewaschene SDS-Gel, die PVDF-Membran (Pall Corporation) und vier Filterpapiere (1,2 – 1,5 mm) wurden für 10 min in Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer äquilibriert. Zuvor wurde die PVDF-Membran in Methanol befeuchtet. Für den Proteintransfer wurden zwei Filterpapiere, die Membran, das Gel und nochmals zwei Filterpapiere zwischen Anode und Kathode eingespannt und die Proteine bei 25 Volt für 10 min auf die Membran übertragen.

Immunodetektion

Zur Immunodetektion von Tryptase β und von Proteinen mit His₆-Tag wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer zunächst für 1 h in PBST mit 5 % Milchpulver blockiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu reduzieren. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper in PBST (Tab. 3.3) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in PBST (3 x 5 min), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in PBST (Tab. 3.3) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal in PBST und dreimal in PBS gewaschen. Zur Detektion der Antikörper-gebundenen Proteine wurde die Membran für 1 min mit Pierce ECL Western Blotting Substrat inkubiert. Dann wurde ein Chemilumineszenz-Film für 0,5 – 1,5 min auf die Membran gelegt, belichtet und anschließend nach Herstellerangaben entwickelt.

Um auf derselben Membran Tryptase β und β -Aktin zu detektieren, wurde zunächst der Western Blot zur Detektion von Tryptase β durchgeführt. Nach der Entwicklung des Films wurde die Membran dreimal 5 min in PBS gewaschen und für 1 h in PBST + 5 % Milchpulver blockiert. Anschließend wurde ein Western Blot für die Detektion des β -Aktins wie beschrieben durchgeführt.

Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Tryptase β	Kaninchen anti Tryptase, polyklonal 1:10.000	Ziege anti Kaninchen, polyklonal 1:10.000
β -Aktin	Ziege anti Aktin, polyklonal 1:500	Kaninchen anti Ziege, polyklonal 1:10.000
His ₆	Maus anti-His ₆ -HRP 1:200	—

Tab. 3.3: In der Immunodetektion verwendete Antikörper und deren Endkonzentrationen.

3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Beurteilung von Größe und Granularität der HMC-1 Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Zunächst wurden Zytopräparate mit Hilfe des Hettich Zyto-Systems hergestellt. Dafür wurde das benötigte Volumen der Zellsuspension (2×10^4 Zellen in 100 μ l) aus der Kultur entnommen, die Zellsuspension in die Zytokammern eingefüllt und die Zellen mit 28 x g für 7 min bei Raumtemperatur auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Zytopräparate wurden über Nacht für ≥ 12 h bei -20 °C kryofixiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden steril filtrierte Puffer verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Präparate wurden einmal 30 s in PBS gewaschen, 30 s in Aceton/Glyoxal (200:1) fixiert und erneut in PBS (3 x 5 min) gewaschen. Dann wurden die Zellen in 0,05 % Tween-20 für 15 min permeabilisiert, gefolgt von Waschschritten in PBS (3 x 5 min). Die Präparate wurden 10 min mit 3 % BSA in PBS blockiert, danach einmal 5 min in PBS gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti-Tryptase β , 1:500) in PBST mit 1 % BSA für 1 h, ein Waschschriff in PBST (3 x 5 min) und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen, 1:1000) in PBST mit 1 % BSA für 1 h im Dunkeln. Danach wurde dreimal 5 min in PBST gewaschen und mit dem 'VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium with DAPI' gegengefärbt und versiegelt. Die fertigen Immunfluoreszenzpräparate wurden im Dunkeln gelagert, bis sie unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgewertet wurden.

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden unter dem Mikroskop mit Alexa Fluor- und DAPI-Filtern (Tab. 3.4) nachgewiesen. Zur Dokumentation wurden Fotografien mit einer Canon EOS 60D Spiegelreflexkamera angefertigt.

Farbstoff	Anregung	Emission
Alexa Fluor 488	450 – 490 nm	515 nm
DAPI	365 nm	420 nm

Tab. 3.4: Zur Fluoreszenzmikroskopie verwendete Filter.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Quantifizierung von Tryptase in Mastzellen

4.1.1 Optimierung der Propagierung der HMC-1 Zelllinie

Um HMC-1 Mastzellen in großer Anzahl und mit hoher Aktivität der Tryptase pro Zelle zu generieren, wurde die Propagierung der Stammkultur in Vorversuchen optimiert. Dazu wurde die Mastzelllinie HMC-1 in unterschiedlichen Anfangsdichten ($1 - 4 \times 10^5$ Zellen pro ml) in IMDM-Medium mit 10 % fötalem Serum in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Über eine Kultivierungszeit von 7 Tagen wurden täglich Proben entnommen und die Zelldichte mittels Casy-Zellzählgerät (s. 3.4.2) sowie die Aktivität der Tryptase in Zelllysaten mittels eines fluorimetrischen Tests (s. 3.4.4) quantifiziert.

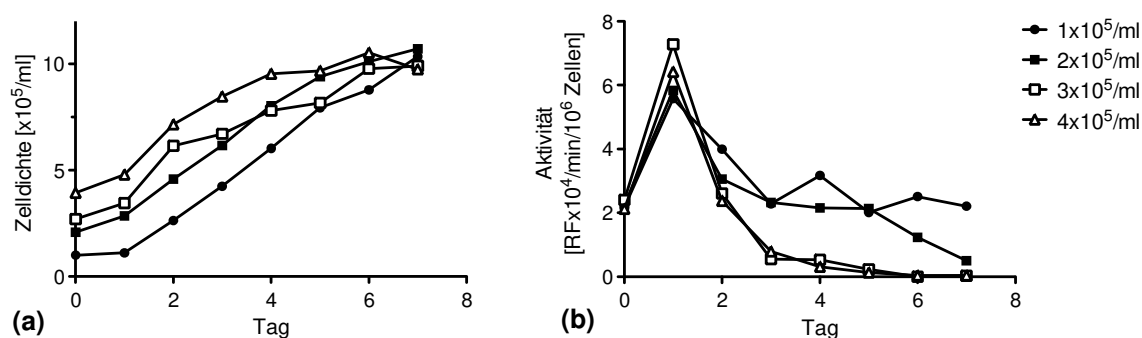


Abb. 4.1: Verlauf von Zelldichte und Tryptaseaktivität während der Kultur von HMC-1 Mastzellen. Kulturen der Mastzelllinie HMC-1 wurden bei verschiedenen Anfangsdichten in serumhaltigem IMD-Medium in T75-Zellkulturflaschen über sieben Tage kultiviert. Die Zellzahl und die enzymatische Aktivität der Tryptase wurden täglich mit dem Casy-Zellzählgerät bzw. einem enzymkinetischen Test bestimmt. **a)** Zunahme der Zelldichte während der Kultur. **b)** Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der Tryptase in Lysaten der HMC-1 Zellen.

Die Zellzahl stieg über 7 Tage kontinuierlich an und erreichte in allen Kulturen eine ähnliche Dichte von etwa 10×10^5 Zellen pro ml (Abb. 4.1a). In Kulturen, die mit hohen Anfangsdichten ausgesät worden waren, zeigten die Zellen lichtmikroskopisch eine unregelmäßigere Morphologie und es war deutlich mehr Zelldebris im Medium zu sehen. Die Tryptaseaktivität pro Zelle stieg in allen Kulturen zunächst an, bei Ausgangsdichten von $1 - 2 \times 10^5$ Zellen pro ml war sie anschließend von Tag 3–6 weitgehend konstant und im Bereich des Ausgangswertes, während bei hohen Aussaat-Dichten die Aktivität rasch gegen

Null abfiel (Abb. 4.1b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aussaat bei hoher Zelldichte nicht zu höheren Zellzahlen während der Kultur führt, sondern zu mehr Zelldebris und geringerer Tryptaseaktivität pro Zelle, die als Anzeichen einer geringeren Vitalität bzw. toxischer Effekte zu werten sind. Zur optimalen Aufrechterhaltung der Stammkulturen wurde deshalb eine Aussaat bei einer Zelldichte von $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen pro ml gewählt und die Kulturen alle vier Tage gesplittet.

4.1.2 Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Tryptaseaktivität während Kurzzeitkulturen

Um die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Tryptaseaktivität im Verlauf von Kurzzeitkulturen zu überprüfen, wurden HMC-1 Zellen in 48-Wellplatten bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml ausgesät. Nach 5, 60, 240 und 360 min wurden Proben genommen, Zelllysate hergestellt und die enzymatische Aktivität der Tryptase fluorimetrisch bestimmt. Die Tryptaseaktivität in den einzelnen Kurzzeitkulturen lag im Bereich von 500 bis 3500 RF/min und streute damit deutlich (Abb. 4.2a). Diese große Spannweite ist vermutlich durch die biologische Schwankung in den Zellkulturen, wie z. B. durch nicht homogene Aussaat, insbesondere aber durch die fluorimetrische Messung, die ohne Standard durchgeführt wurde, bedingt. Innerhalb einer Kurzzeitkultur blieb die Aktivität bezogen auf den Ausgangswert bei $t = 0$ dagegen weitgehend stabil und stieg im Mittel auf $115 \pm 3 \%$ und $134 \pm 4 \%$ nach 240 bzw. 360 min ($n=69$) an (Abb. 4.2b). Die Färbung der Zellen mit Trypan Blau zeigte nach 360 min $95 \pm 2 \%$ ($n=24$) vitale Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tryptaseaktivität unter diesen Bedingungen reproduzierbar quantifiziert werden kann und gleichzeitig über den Kultivierungszeitraum rund 95 % der Zellen vital bleiben. Der Anstieg der Tryptaseaktivität im Zeitverlauf ist wahrscheinlich Folge der Manipulation der Zellen, des Mediumwechsels und der Zunahme der Zellzahl, die bei einer Verdopplungszeit von ca. 48 h jedoch gering ist.

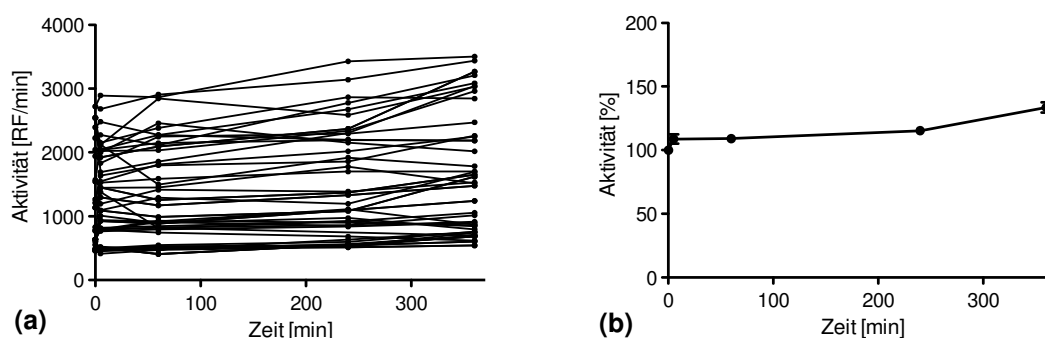


Abb. 4.2: Bestimmung der Tryptaseaktivität in HMC-1 Mastzellen im Verlauf von Kurzzeitkulturen. HMC-1 Zellen wurden in einer 48-Wellplatte ausgesät, Proben nach 5, 60, 240 und 360 min genommen und die enzymatische Aktivität der Tryptase im Zelllysate bestimmt. **a)** Verlauf der Tryptaseaktivität in 69 Kurzzeitkulturen; **b)** Mittelwert \pm SEM relativ zur Aktivität bei $t=0$, $n=69$.

4.1.3 Optimierung der Herstellung von HMC-1 Zelllysaten

Um die Herstellung von Lysaten der HMC-1 Zellen zu optimieren, wurden verschiedene Puffer und Methoden verglichen und anschließend die Tryptaseaktivität im fluorimetrischen Test bestimmt. HMC-1 Zellen wurden zunächst in Puffern mit unterschiedlichem pH (pH 6 vs. pH 7,6), NaCl-Konzentration (0,3 M vs. 1 M) und Detergenzgehalt (0 % vs. 0,05 % Tween) lysiert. Puffer mit 0,3 M NaCl beinhalteten zusätzlich 50 μ g/ml Heparin. Ein Teil der Proben wurde nach der Lyse mit Ultraschall für dreimal zwei Sekunden behandelt und/oder mit DNase (0,2 U/ μ l) versetzt. Anschließend wurde die Aktivität der Tryptase im Lysat fluorimetrisch quantifiziert und auf die Probe mit der höchsten Aktivität normiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die eingesetzten Methoden und Puffer einen deutlichen Einfluss auf die Wiederfindung der Tryptaseaktivität im Zelllysate haben, die Messungen mit der höchsten und niedrigsten Aktivität unterscheiden sich um 70 %. Der pH-Wert und die NaCl-Konzentration/Heparin haben den größten Einfluss auf die Wiederfindung. Ein pH-Wert von 6 erhöht die Tryptaseaktivität um rund 25 % gegenüber einem pH von 7,6 und die 0,3 M NaCl-Konzentration + 50 μ g/ml Heparin erhöht sie um 20 % gegenüber der 1 M NaCl-Lösung. Dagegen hat die Ultraschallbehandlung nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität, insbesondere wenn Detergenz im Puffer enthalten ist (12 % vs. 2 %). Das Detergenz per se erhöht die Wiederfindung um 15 %. Die Zugabe von DNase hat auf die Aktivität keinen Einfluss. Da die ersten beiden Versuche nahezu identische Ergebnisse ergaben, wurde auf einen weiteren

Versuch verzichtet (Abb. 4.3). In den weiterführenden Experimenten wurde zur Herstellung von HMC-1 Zelllysaten die Methode mit der höchsten Tryptasewiederfindung eingesetzt, d. h. ein Lysepuffer mit einem pH-Wert 6, 0,3 M NaCl + 50 µg/ml Heparin und 0,05 % Tween sowie eine anfolgende Behandlung mit Ultraschall. Obwohl DNase keinen Einfluss auf die Aktivität hat, wurde sie weiterhin eingesetzt, da sie die weitere Handhabung der Lysate deutlich erleichterte.

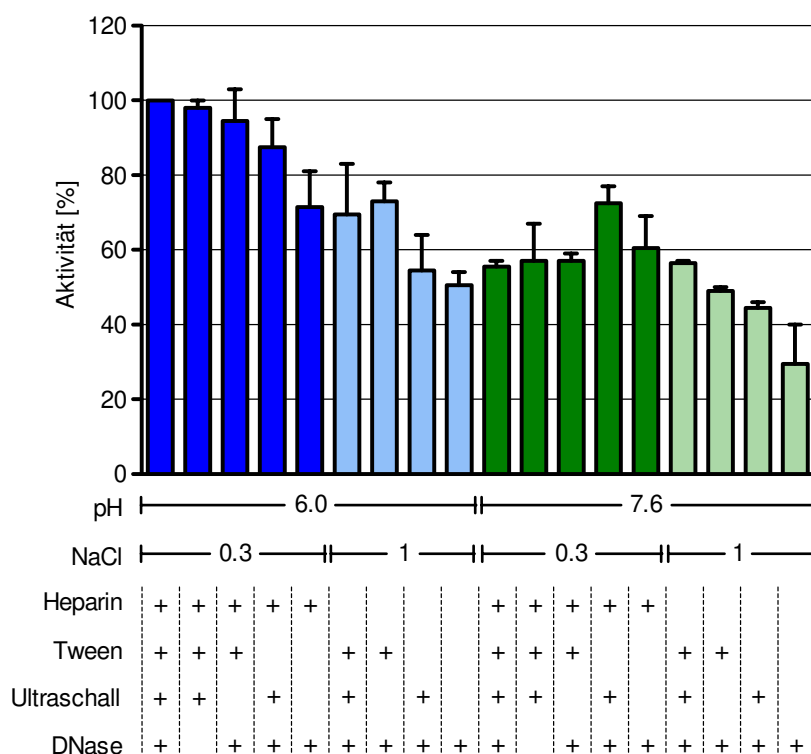


Abb. 4.3: Optimierung der Herstellung von HMC-1 Zelllysaten. Um den Einfluss verschiedener Lysepuffer (pH-Wert, NaCl-Konzentration, Heparin, Detergenz) sowie von DNase und Ultraschallbehandlung auf die Tryptaseaktivität im Lysat zu untersuchen, wurden verschiedene Kombinationen zur Herstellung der Zelllysate verwendet und anschließend die Tryptaseaktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden auf die Bedingung pH 6/0,3 M NaCl/50 µg/ml Heparin/0,05 % Tween/Ultraschall/DNase normalisiert. Mittelwert \pm Range, $n=2$.

4.1.4 Einfluss des Assay-Substrates

Um den fluorogenen Aktivitätsassay für Tryptase zu validieren, wurden zwei fluorogene Substrate, tos-Gly-Pro-Arg-AMC (t-GPR-AMC) und tos-Gly-Pro-Lys-AMC (t-GPK-AMC), die beide zur Messung der Tryptaseaktivität eingesetzt werden [43], verglichen. Dafür wurde die Aktivität in HMC-1 Zelllysaten verschiedener Subzelllinien mit beiden Substraten im fluorimetrischen Test gemessen.

Bei der Bestimmung wurden mit beiden Substraten eng korrelierende Ergebnisse erzielt.

Die Aktivitätsmessungen mit t-GPR-AMC ergaben im Mittel Aktivitätswerte, die um rund 10 % ($0,3 \times 10^4$ RF/min/ 10^6 Zellen) höher waren als mit t-GPK-AMC (Abb. 4.4). In den weiteren Versuchen wurde deshalb tos-Gly-Pro-Arg-AMC als Standard-Substrat zur Messung der Tryptaseaktivität eingesetzt.

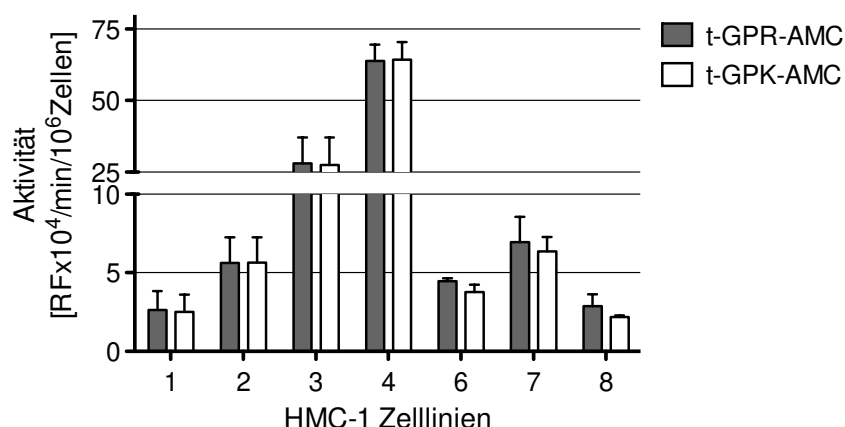


Abb. 4.4: Vergleich der Bestimmung der Tryptaseaktivität mit den Substraten t-GPR-AMC und t-GPK-AMC. Die Tryptaseaktivität wurde in Zelllysaten verschiedener HMC-1 Subzelllinien bestimmt. Mittelwert \pm Range, $n=2$.

4.1.5 Analyse der ‚Tryptaseaktivität‘ im Zelllysate

Da das Substrat t-GPR-AMC nicht spezifisch Tryptase β nachweist, sondern auch durch andere Proteasen, insbesondere Trypsin und Thrombin, gespalten wird, wurde im Folgenden überprüft, ob die gemessene Aktivität im HMC-1 Zelllysate auf Tryptase β , kontaminierendes Thrombin oder andere Proteasen zurückzuführen ist. Dafür wurden HMC-1 Zelllysate, rekombinante Tryptase β und isoliertes Thrombin für eine Stunde mit spezifischen β -Tryptaseinhibitoren sowie verschiedenen Serin-, Cystein- und Metalloprotease-Inhibitoren inkubiert und anschließend die residuale Aktivität gemessen. Die Aktivität im Zelllysate wird durch Pefabloc-SC, einen unspezifischen Serinprotease-Inhibitor, sowie durch die synthetischen, spezifischen β -Tryptaseinhibitoren Byk 296172 und NS222 fast vollständig gehemmt (87 ± 5 %, 97 ± 0.3 % bzw. 70 ± 8 % Hemmung, $n=3$). Diese Werte entsprechen weitgehend der Hemmung der rekombinanten Tryptase β , die durch diese Inhibitoren ebenfalls nahezu

vollständig gehemmt wird ($95 \pm 2 \%$, $97 \pm 0.6 \%$ bzw. $87 \pm 1 \%$ Hemmung). Darüber hinaus hemmt rLDTI (rekombinanter Leech-derived Tryptase Inhibitor, s. 2.4.1) sowohl die Aktivität im Zelllysate als auch die Aktivität der rekombinanten Tryptase β um rund 50 % ($45 \pm 6 \%$ bzw. $53 \pm 2 \%$), ein spezifisches Merkmal der Interaktion dieses Inhibitors mit dem Tryptase β -Tetramer (Abb. 4.5, Block 1). Andererseits wird die Aktivität im HMC-1 Zelllysate durch Inkubation mit den Thrombininhibitoren Hirudin und Antithrombin nicht wesentlich reduziert (Hemmung $<20 \%$), sodass eine Beteiligung von Thrombin an der Aktivität des Zelllysates weitgehend ausgeschlossen werden kann. Aprotinin und $\alpha 1$ -PI haben ebenfalls keinen signifikanten Effekt, sodass Plasmin und weitere Serinproteasen nicht für die Aktivität im Zelllysate verantwortlich sein können (Abb. 4.5, Block 2). Auch die Inhibitoren von Metallo- und Cysteinproteasen (Abb. 4.5, Block 3), E64 und EDTA, besitzen nur einen geringen Effekt ($<15 \%$) auf die Aktivität, der von 1,10-Phenanthrolin (20 – 30 %) entspricht der Lösemittel-Kontrolle (1 % DMSO).

Die Hemmspektren der ‚Tryptaseaktivität‘ im HMC-1 Zelllysate und rekombinanter Tryptase β stimmen also weitgehend überein und unterscheiden sich deutlich von dem des Thrombin. Zusätzlich wird die Aktivität im HMC-1 Zelllysate durch spezifische β -Tryptaseinhibitoren fast vollständig gehemmt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die im Lysate gemessene ‚Tryptaseaktivität‘ weitgehend von Tryptase β innerhalb der Mastzellen stammt. Im Rahmen der Arbeit werden deshalb die Begriffe ‚Tryptaseaktivität‘ und ‚Tryptase β -Aktivität‘ synonym verwendet.

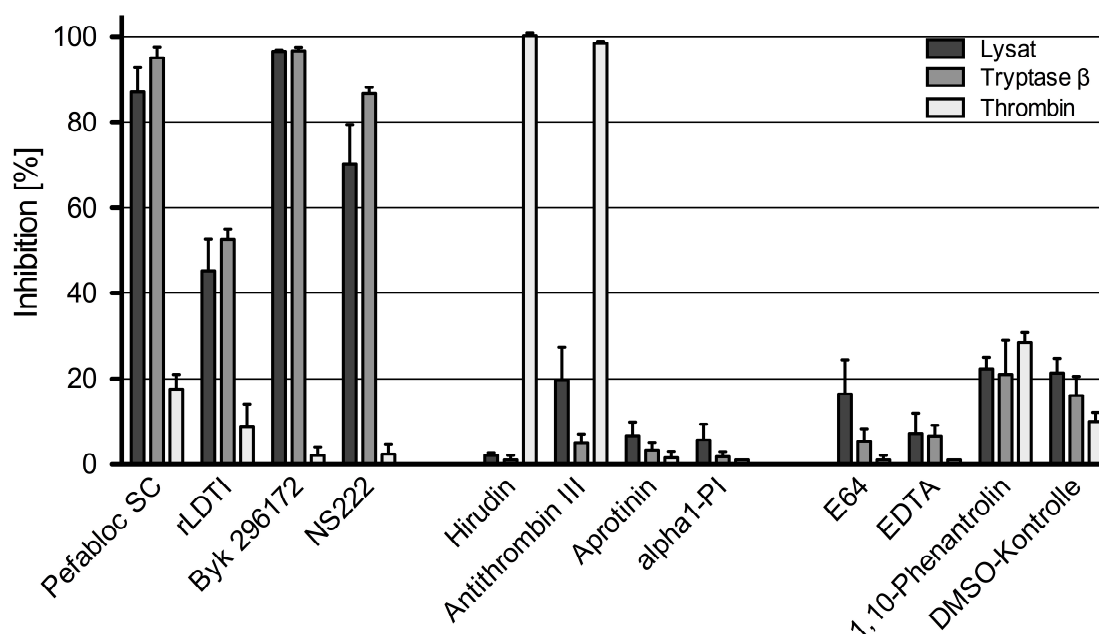


Abb. 4.5: Vergleich der Hemmung der ‚Trypsinaktivität‘ im HMC-1 Zelllysate mit der von isolierter Trypsin β und Thrombin. Das Zelllysate bzw. die Proteasen wurden für eine Stunde mit Serin-, Cystein- und Metalloprotease-Inhibitoren inkubiert und anschließend die residuale Aktivität bestimmt. **Block 1:** Serinprotease-Inhibitoren, die Trypsin β hemmen: Pefabloc-SC (10 μ M), rLDTI (20 nM), Byk 296172 (1 μ M), NS222 (100 nM). **Block 2:** Serinprotease-Inhibitoren, die Trypsin β nicht hemmen: Hirudin (100 nM), Antithrombin (1 μ M), Aprotinin (1 μ M), α 1-Proteinaseinhibitor (100 nM). **Block 3:** Cystein- und Metalloprotease-Inhibitoren: E64 (5 mM), EDTA (10 mM), 1,10-Phenanthroline (1 mM), DMSO-Kontrolle (1 %). Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

4.1.6 Bestimmung des Trypsinergehalts verschiedener HMC-1

Subzelllinien

Um die HMC-1 Zelllinie, die ursprünglich von J. H. Butterfield zur Verfügung gestellt wurde [26], und davon abgeleitete Zelllinien, die u. a. durch Klonierung und Transfektion hergestellt wurden, hinsichtlich ihrer Eignung für die geplanten Versuche zu vergleichen wurde der Trypsinergehalt über die Bestimmung der enzymatischen Aktivität und mittels Western Blot quantifiziert (Abb. 4.6). Dafür wurden von jeder HMC-1 Subzelllinie Zelllysate hergestellt, die dann sowohl im fluorimetrischen Aktivitätsassay als auch zur Generierung von Western Blot Proben verwendet wurden. Die gemessene Trypsinaktivität wurde über einen Trypsin β -Standard und die Zellzahl in den Trypsinergehalt pro Zelle umgerechnet. Die Western Blot Proben (aus je 200.000 Zellen) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf ihren Trypsinergehalt hin untersucht (s. 3.2.2). Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Die Quantifizierung der Tryptase β über die enzymatische Aktivität (Abb. 4.6a) zeigt, dass 9 von 11 überprüften Subzelllinien ähnlich viel Tryptase pro Zelle enthalten ($0,03 - 0,12 \text{ pg/Zelle}$). Eine Ausnahme bilden die Subzelllinien 3 und 4, die entsprechend ihrer höheren Differenzierung deutlich mehr Tryptase pro Zelle enthalten ($0,5 \pm 0,1$ bzw. $1,1 \pm 0,2 \text{ pg/Zelle}$).

Die densitometrische Analyse der Western Blot Proben zeigt vergleichbare Ergebnisse. Zur semiquantitativen Bestimmung der immunreaktiven Tryptasemenge pro Zelle wurden die Banden densitometrisch ausgewertet, auf β -Aktin normalisiert und auf den Tryptase β -Standard normiert (Abb. 4.6b, $n=3-5$). Wie bei der über die Aktivität berechneten Tryptasemenge pro Zelle enthalten die Subzelllinien 3 und 4 deutlich mehr Tryptase ($3,4 \pm 2,8$ bzw. $4,2 \pm 3,4 \text{ pg/Zelle}$) als die übrigen Subzelllinien, welche zwischen $0,12$ und $1,7 \text{ pg}$ Tryptase pro Zelle enthalten.

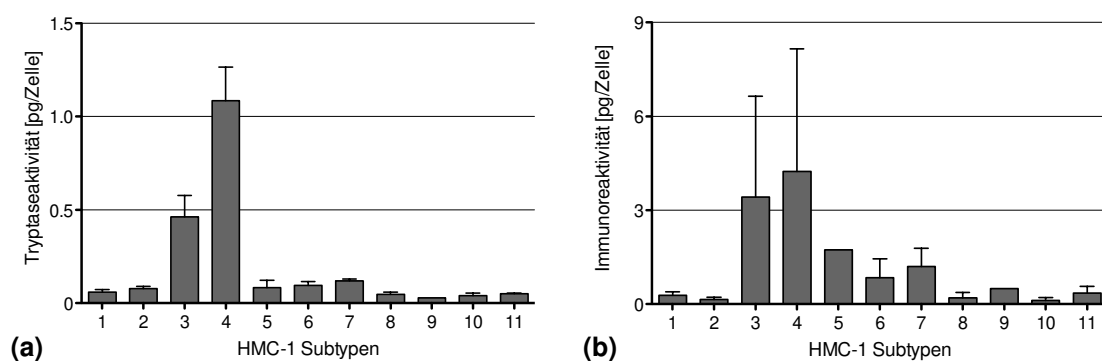


Abb. 4.6: Vergleich des Tryptasegehalts verschiedener HMC-1 Subtypen. **a)** Tryptasegehalt der HMC-1 Subtypen berechnet über die enzymatische Tryptaseaktivität, $n=4-6$ (Nr.9: $n=1$, Nr. 5: $n=2$). **b)** Densitometrische Analyse des Tryptasegehalts der HMC-1 Subtypen berechnet über die Immunoreaktivität im Western Blot (s. Abb. 4.7), $n=3-5$.

Der repräsentative Western Blot (Abb. 4.6a) zeigt, dass die primären Banden der Proben wie die Bande des Tryptase β -Standards (Nr. 12) eine Größe von ungefähr 35 kDa aufweisen und somit der Größe des Tryptase-Monomers entsprechen. Zusätzliche Banden finden sich bei ca. 25 kDa (bei Proben 3, 4, 6) und 60 kDa (Probe 7), diese entsprechen wahrscheinlich Degradationsprodukten bzw. Aggregaten.

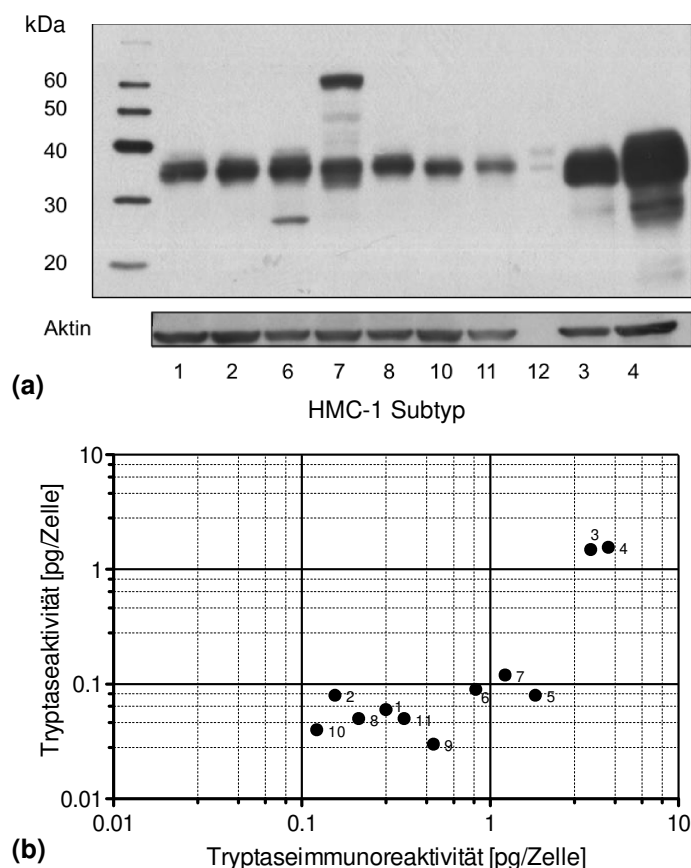


Abb. 4.7: **a)** Repräsentative Western Blot-Analyse mit Darstellung des Tryptasegehalts in den Zelllysaten verschiedener HMC-1 Subtypen aus je 200.000 Zellen. β -Aktin wurde zur Kontrolle des Proteingehalts der Proben verwendet; Links: Größenstandard in kDa. **b)** Vergleich des Tryptasegehalts der HMC-1 Subtypen mittels Quantifizierung der Tryptase über die Immunoreaktivität (Abb. 4.b) und über die Tryptaseaktivität (Abb. 4.a).
 1. HMC-1 (1496), 2. HMC-1 (1596), 3. HMC-1.1, 4. HMC-1.2, 5. HMC-1 (1696),
 6. HMC-1 alpha Transfektant, 7. HMC-1-beta Transfektant, 8. HMC-1-gamma.1 Transfektant,
 9. HMC-1-gamma.2 His Transfektant, 10. HMC-1-delta Transfektant, 11. HMC-1-eYFP Transfektant, 12. rekombinante Tryptase β , 10ng.

Der Vergleich des Tryptasegehalts, der über die Aktivität berechnet wurde, mit dem, der über den Western Blot berechnet wurde, zeigt eine deutliche Korrelation der Messwerte: Subzelllinien die einen höheren Tryptasegehalt pro Zelle im Western Blot aufzeigen besitzen ebenfalls über die Aktivität berechnet einen höheren Tryptasegehalt (Abb. 4.7b). Es fällt auf, dass der immunologisch bestimmte Tryptasegehalt pro Zelle 3 – 15-mal höher liegt, als der über die enzymatische Aktivität berechnete. Dies kann darin begründet sein, dass der Western Blot auch enzymatisch inaktive Monomere und Zymogene detektiert. Darüber hinaus können während der Lysatherstellung aktive Tryptase-Tetramere inaktiviert werden und in der Aktivitätsmessung nicht erscheinen. Ferner kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass methodische oder systematische

Fehler durch die völlig unterschiedlichen Detektionsverfahren in die Bestimmung eingehen.

Basierend auf den Ergebnissen wurde für Experimente bis 6 h die primäre HMC-1 Zelllinie von J. H. Butterfield benutzt (Nr. 1), da die Zellen ausreichend Aktivität besitzen und Stammkulturen besser proliferieren als die anderen Zelllinien. Andere Subzelllinien, insbesondere HMC-1.2, wurden für besondere Zwecke verwendet, bei denen z. B. nur geringe Zellzahlen eingesetzt werden konnten und längere Inkubationszeiten (z. B. über 48 h) verwendet wurden.

4.2 Anpassung der Methodik an das 96-Well

Mikrotiterplatten-Format

Zur Verringerung des Materialverbrauchs, insbesondere die benötigte Menge der Inhibitoren, und des experimentellen Aufwandes, wurde die initial verwendete Methodik von 48-Well auf 96-Well Mikrotiterplatten übertragen. Gleichzeitig wurde die Inkubationszeit auf bis zu 48 h verlängert, um auch Langzeiteffekte auf die Tryptaseaktivität erfassen zu können. Für diesen Ansatz wurde die Mastzelllinie HMC 1.2 verwendet, die mehr Tryptase pro Zelle besitzt als die Originalzelllinie (s. 4.1.6), sodass geringere Zellzahlen bzw. Zelldichten möglich waren. In Vorversuchen wurde eine Zelldichte von $3,3 \times 10^5$ Zellen pro ml (i. e. $9,9 \times 10^4$ Zellen pro Well) als optimal ermittelt, da diese einen guten Kompromiss zwischen der zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität notwendigen Zellzahl und der Vitalität der Zellen darstellt.

Durch die Inkubation der Zellen in 96-Wellplatten war die zeitaufwendige Überführung der Proben aus 48-Wellplatten in 1,5 ml Reaktionsgefäße und die weitere Verarbeitung der Einzelproben (z. B. Zentrifugation, Waschen der Zellen) nicht mehr notwendig. Alle Arbeitsschritte konnten mit Hilfe einer Multikanal-Pipette vollständig in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Auf die Ultraschallbehandlung sowie die Zugabe von DNase wurde verzichtet (Abb. 4.8). Mit dieser Methodik konnte der Zeitaufwand um mindestens eine Stunde verringert werden und die Zahl der Proben gleichzeitig von 48 auf 96 erhöht werden. Allerdings sind für 96 Proben vier nacheinander verwendete 96-Wellplatten notwendig, eine weitere Reduktion des Materialverbrauchs wäre daher wünschenswert. Außerdem mussten alle Verfahren erneut hinsichtlich ihrer

Reproduzierbarkeit und Präzision untersucht werden und neue Methoden zur Bestimmung der Toxizität und Zellzahl (s. 4.2.2) eingeführt werden.

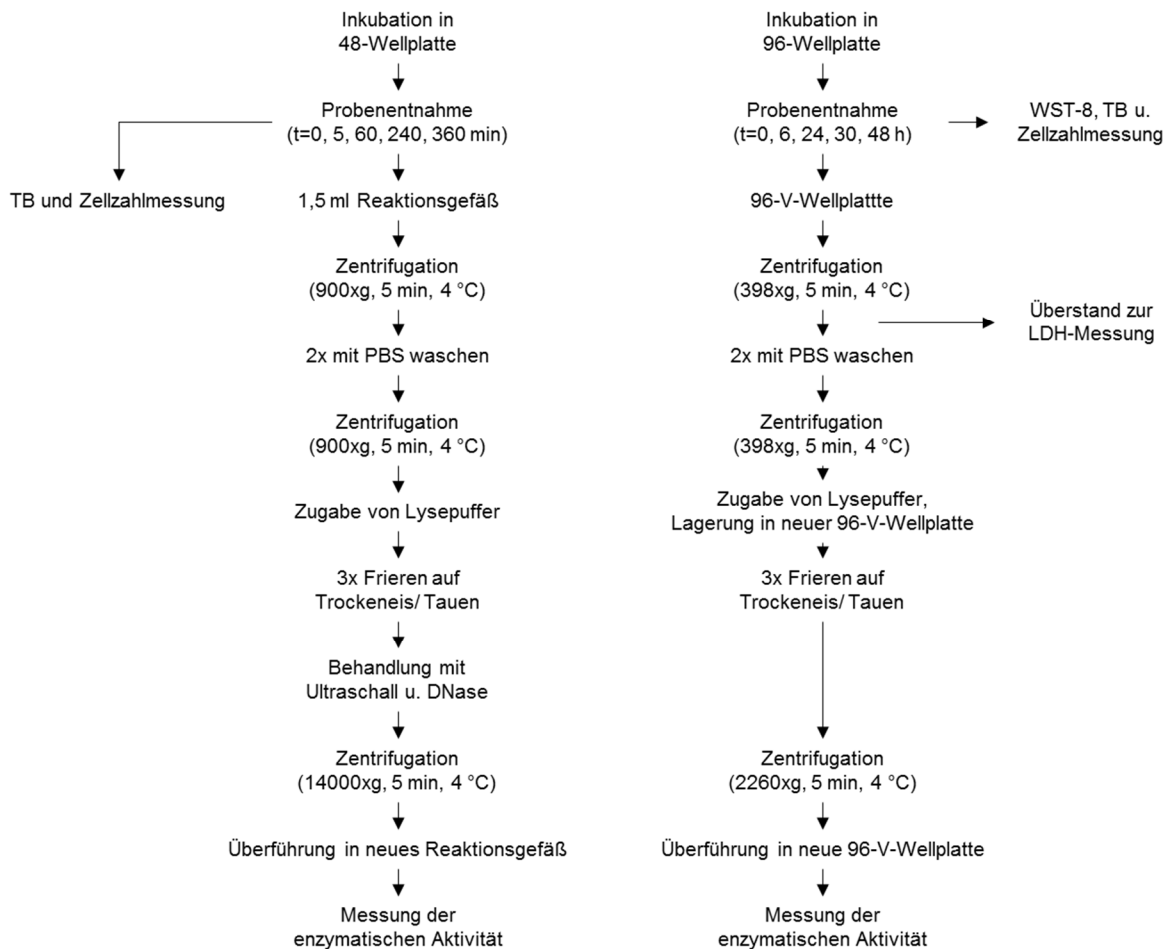


Abb. 4.8: Vergleich des Vorgehens zur Quantifizierung der Tryptaseaktivität; TB = Trypan Blau.

4.2.1 Vergleich der Methoden

Um die Methoden hinsichtlich der Reproduzierbarkeit miteinander zu vergleichen, wurden der relative Variationskoeffizient der enzymkinetischen Quantifizierung der Tryptase und des Gesamtexperimentes (Zellkultur, Produktion der Zelllysate, enzymkinetische Messung) bestimmt.

Zur Bestimmung der Präzision der enzymkinetischen Quantifizierung wurden im Aktivitätstest Replikate von 220 Proben (Methode 1,5 ml Reaktionsgefäß) bzw. 230 Proben (Methode 96-Well Mikrotiterplatte) gemessen und die Variabilität der Messwerte bestimmt (Tab. 4.1). Der relative Variationskoeffizient der Replikate beträgt 4,6 % bzw. 7,3 %.

Methode	Proben (Replikate)	Relativer Variationskoeffizient [%]	Ausreißer mit %-VK >10 %
1,5 ml Reaktionsgefäß	220	4,60	11 von 220
96-Wellplatte	230	7,29	29 von 230

Tab. 4.1: Reproduzierbarkeit der enzymatischen Messung.

Der niedrigere Variationskoeffizient ist vor allem durch weniger Ausreißer >10 % zu erklären (11 aus 220 bzw. 29 aus 230 Wertepaaren). Lässt man diese Ausreißer bei der Berechnung außer Acht, sind die Variationskoeffizienten der enzymkinetischen Messung mit 3,5 % bzw. 4,8 % annähernd gleich groß.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Gesamtexperimentes wurde die Variabilität der Messwerte aus 10 bzw. 15 biologischen Triplikaten bestimmt. Hier kam es tendenziell zu mehr Ausreißern im 1,5 ml Reaktionsgefäß (4 von 10 bzw. 3 von 15). Der relative Variationskoeffizient des Gesamtexperimentes der 96-Wellplattenmethodik ist annähernd so groß wie der der enzymatischen Messung in der 96-Well-Mikrotiterplatte (6,8 % bzw. 7,3 %), während der Variationskoeffizient bei Verwendung von 1,5 ml Reaktionsgefäßen um 3 % größer ist als bei der enzymkinetischen Messung. Die Zellkultivierung und die Herstellung von Lysaten trägt also bei der Verwendung von 1,5 ml Reaktionsgefäßen deutlich zur Variabilität der Messwerte im Gesamtexperiment bei, im Gegensatz dazu spielt dies im 96-Wellplattenformat praktisch keine Rolle (Tab. 4.2).

Methode	Proben (Triplikate)	Relativer Variationskoeffizient [%]	Ausreißer mit %-VK >10 %
1,5 ml Reaktionsgefäß	10	7,61	4 von 10
96-Wellplatte	15	6,79	3 von 15

Tab. 4.2: Reproduzierbarkeit des Gesamtexperiments.

4.2.2 Validierung von Methoden zur Zelldichte- und Vitalitätsbestimmung in der Mikrotiterplatte

Die manuelle Bestimmung der Zellzahl mit dem Casy-Zellzählgerät und der Vitalität mittels Trypan Blau-Färbung in der Zählkammer ist nur für Einzelproben geeignet. Für die Experimente im 96-Well Format wurden deshalb zur parallelen Bestimmung von bis zu 96 Proben das 'Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)' für die Bestimmung der Zelldichte und das 'LDH Cytotoxicity Kit II' für die Bestimmung der Toxizität eingeführt und validiert.

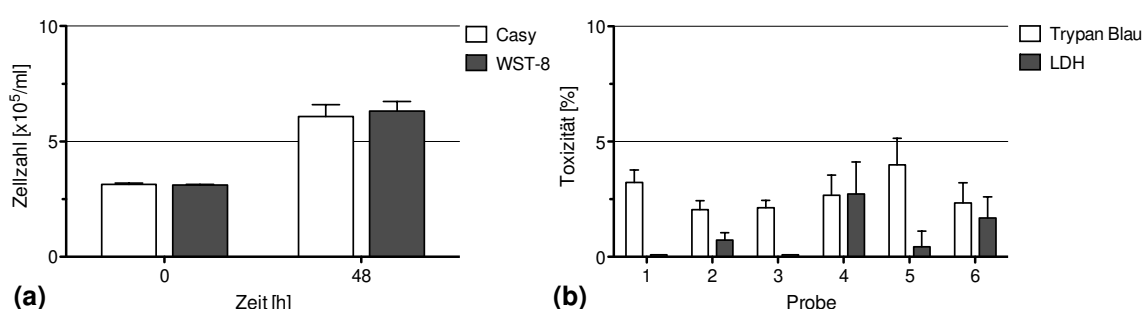


Abb. 4.9: Vergleich verschiedener Messmethoden der Zelldichte- und Vitalitätsbestimmung. **a)** Verlauf der HMC-1 Zelldichte während der Inkubation über 48 h. Die Zellzahl wurde sowohl mit dem Casy-Zählgerät als auch mit dem WST-8 Kit bestimmt. Mittelwert \pm SEM, $n=20-30$. **b)** Toxizitätsmessungen nach 48-stündiger Inkubation der HMC-1 Zellen. Nach 48 h wurden Proben entnommen, mit Trypan Blau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt oder aus dem Überstand die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bestimmt. Mittelwert \pm SEM, $n=3-6$.

Zum Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Zelldichte wurden aus einer Zellkultur Proben entnommen und die Zelldichte mittels Casy-Zellzählgerät bestimmt bzw. die Proben laut Anweisungen des 'Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)' präpariert (Abb. 4.9a). Beide Methoden erzielten weitgehend identische Messwerte sowohl am Startzeitpunkt ($3,15$ bzw. $3,11 \times 10^5$ Zellen pro ml) als auch nach 48 h ($6,09$ bzw. $6,32 \times 10^5$ Zellen pro ml). Innerhalb von 48 h verdoppelt sich die Zellzahl, was mit den Ergebnissen zur Zellkultivierung übereinstimmt (vgl. Abb. 4.1a). Die Ergebnisse bestätigen die Vergleichbarkeit beider Methoden.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden, ausgehend von einer Zellkultur, die Zellen entweder mit Trypan Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, oder Proben entnommen, die laut Anweisungen des 'LDH Cytotoxicity Kit II' verarbeitet wurden (Abb. 4.9b). Tendenziell ergibt die Auszählung der mit

Trypan Blau gefärbten Zellen eine höhere Toxizität als die LDH-Messung mittels Kit. Die Ergebnisse zeigen jedoch in allen Proben eine Toxizität <5 % unabhängig von der verwendeten Methode und sind in dieser Hinsicht vergleichbar. Darüber hinaus ist die Messung der LDH-Aktivität eine allgemein akzeptierte Methode für Toxizitätsbestimmungen [154].

4.3 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Aktivität der Tryptase in HMC-1 Zellen

4.3.1 Inkubation von HMC-1 Zellen mit Proteinase-Inhibitoren

Nach der Auswahl einer geeigneten HMC-1 Subzelllinie und der Optimierung der Methoden zur Kultivierung, Zelllysate-Herstellung und Quantifizierung der Tryptase β wurde dieser Versuchsansatz verwendet, um den Einfluss von Proteinase-Inhibitoren auf die intrazellulär gespeicherte Tryptase β zu untersuchen. Dazu wurden HMC-1 Zellen mit irreversiblen und reversiblen bzw. synthetischen und Protein-Typ Inhibitoren über sechs Stunden in 48-Well Mikrotiterplatten inkubiert. Als Kontrollen dienten HMC-1 Zellen, die in Medium ohne Inhibitor bzw. mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren kultiviert wurden. Nach 0, 5, 60, 240 und 360 min wurden Proben entnommen, Zelllysate hergestellt, und die β -Tryptaseaktivität im Zelllysate fluorimetrisch bestimmt. Nach 360 min wurden zusätzlich Zellen entnommen, um die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch zu beurteilen und ihre Vitalität mit Trypan Blau zu bestimmen.

4.3.2 Irreversible Serinproteaseinhibitoren

Pefabloc SC ist ein irreversibler Serinprotease-Inhibitor, der relativ unspezifisch viele Serinproteasen einschließlich Tryptase β hemmt und sich durch eine geringe Toxizität auszeichnet [155]. Während der 6-stündigen Kultivierungszeit fiel die Tryptaseaktivität unter allen Pefabloc SC Konzentrationen zuerst ab, stieg aber nach 60 bzw. 240 min wieder kontinuierlich an. Die Aktivität in den Kontrollen stieg von 550 ± 10 RF/min auf 700 ± 20 RF/min an (Abb. 4.10a). Dies entspricht den Ergebnissen der Vorversuche, die über diesen Zeitraum ebenfalls einen Zuwachs der Aktivität von ca. 30 % verzeichnen (vgl. Abb. 4.2). Um die Effekte verschiedener Inhibitoren besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Tryptaseaktivität der Proben auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt normalisiert (Abb. 4.10b). Die Ergebnisse wurden sowohl im zeitlichen Verlauf (Abb. 4.10b) als auch in Abhängigkeit zur Inhibitorkonzentration (Abb. 4.10c) dargestellt.

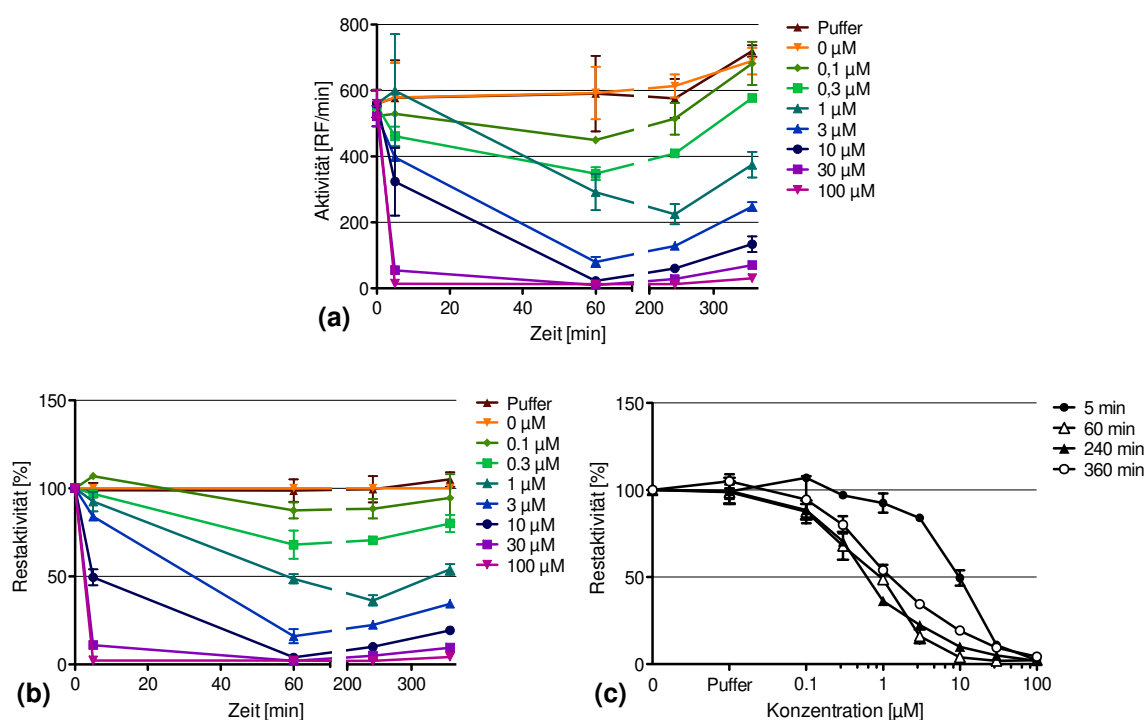


Abb. 4.10: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit Pefabloc SC. Die HMC-1 Zellen wurden in einer 48-Wellplatte mit unterschiedlichen Pefabloc SC Konzentrationen (0 – 100 μ M) inkubiert. Nach 0 – 360 min wurden Proben entnommen, Zellysate hergestellt und die Aktivität gemessen. Mittelwert \pm SEM, $n=3$. **a)** Verlauf der Tryptaseaktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Tryptaseaktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender Pefabloc SC Konzentrationen auf die Aktivität der Tryptase.

Sie zeigen, dass die Inkubation der Zellen mit Pefabloc SC zu einer von Zeit und Konzentration abhängigen Verminderung der Tryptaseaktivität führt. Pefabloc SC-Konzentrationen $\leq 0,1 \mu\text{M}$ haben keinen signifikanten Einfluss auf die Tryptaseaktivität; Konzentrationen ab $30 \mu\text{M}$ hemmen die Tryptaseaktivität bereits nach 5 min über den ganzen Beobachtungszeitraum um $\geq 95 \%$. Zunächst sind $10 \mu\text{M}$ Pefabloc SC notwendig, um eine 50 %-ige Hemmung der Tryptaseaktivität (IC_{50}) innerhalb von 5 min zu erzielen, nach 60 – 360 min sinkt die IC_{50} auf ungefähr $1 \mu\text{M}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tryptase in HMC-1 Zellen durch Zugabe von Pefabloc SC in das Kultivierungsmedium effektiv gehemmt wird. Da die prozentuale Hemmung über die Zeit kleiner wird, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor jedoch nicht stabil ist. Pefabloc SC kann also in den Granula gespeicherte Tryptase hemmen und ist dabei nicht toxisch (s. 4.3.6).

Um zu überprüfen, in wieweit neben Pefabloc SC auch andere irreversible Serinprotease-Inhibitoren Tryptase β in HMC-1 hemmen können, wurde der Effekt von Pefabloc SC (Abb. 4.11a) mit dem von TLCK (Abb. 4.11b) und PMSF (Abb. 4.11c) verglichen. Sowohl TLCK als auch PMSF besitzen, ähnlich Pefabloc SC, einen Zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Tryptaseaktivität. TLCK erreicht eine mit Pefabloc SC vergleichbare maximale Hemmung ($85 \pm 5 \%$), erlangt diese aber erst später (60 vs. 5 min) und nur in höherer Konzentration (1000 vs. $100 \mu\text{M}$) als Pefabloc SC. Konzentrationen zwischen 1 und $10 \mu\text{M}$ zeigen nach 360 min tendenziell eine eher höhere Aktivität als die Kontrolle. PMSF, das dem Pefabloc SC strukturell ähnlich ist, erreicht in einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ erst nach 360 min eine maximale Hemmung der Tryptaseaktivität von $46 \pm 3 \%$; eine weitere Steigerung der PMSF Konzentration war aufgrund toxischer Effekte nicht möglich ($>99 \%$ der HMC-1 Zellen nicht mehr vital). Somit können beide Inhibitoren die Tryptaseaktivität ebenfalls hemmen, der Vergleich der IC_{50} -Werte nach 240 min von PMSF ($1250 \mu\text{M}$) und TLCK ($222 \mu\text{M}$) zeigt aber, dass ihre Effektivität 2000- bzw. 300-fach geringer ausgeprägt ist als die von Pefabloc SC ($0,7 \mu\text{M}$).

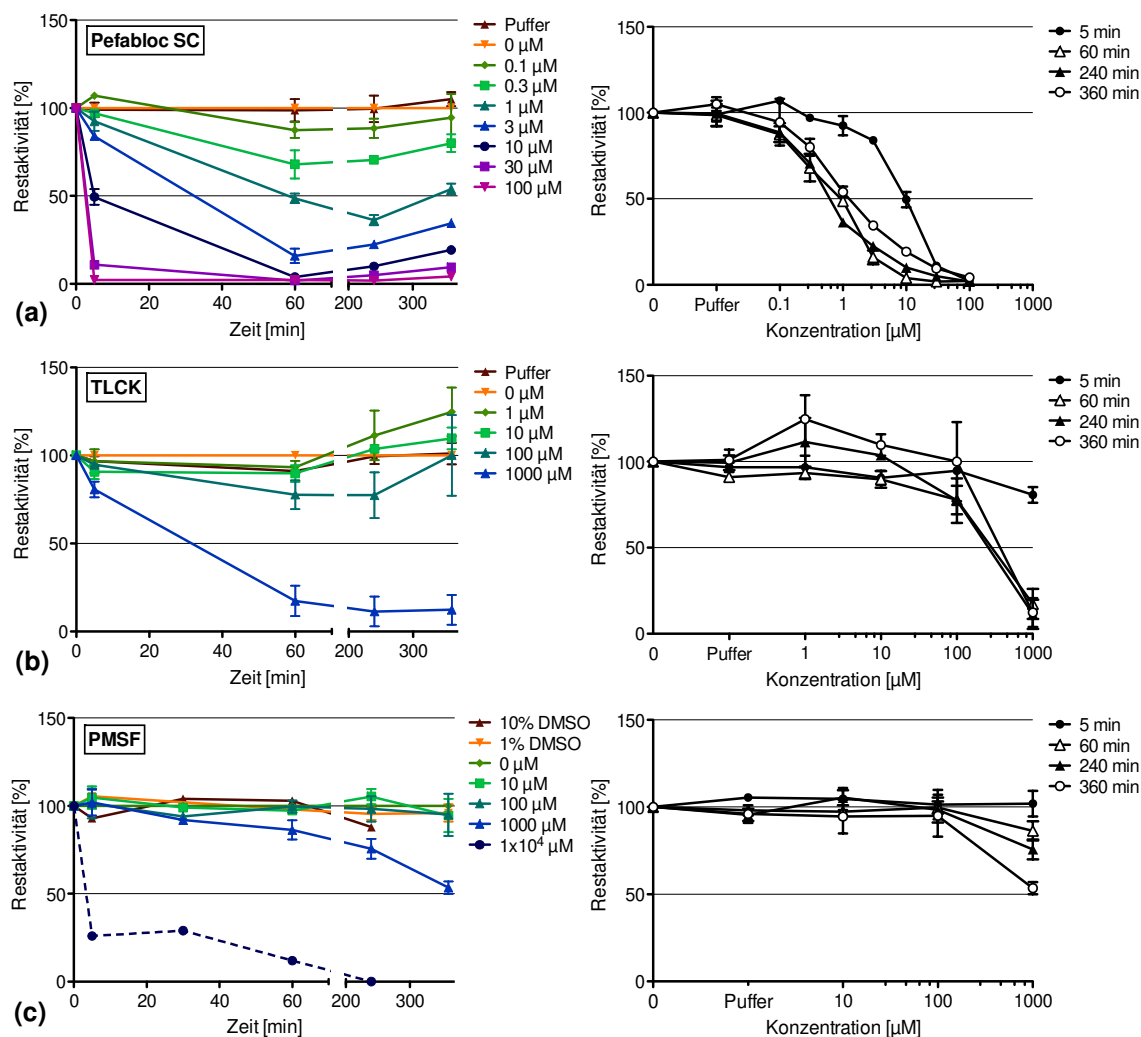


Abb. 4.11: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit verschiedenen irreversiblen Inhibitoren. HMC-1 Zellen wurden in einer 48-Wellplatte mit **a)** Pefabloc SC, **b)** TLCK und **c)** PMSF inkubiert. Nach 0 – 360 min wurden Proben entnommen, Zellsyate hergestellt und die Aktivität gemessen. Die Tryptaseaktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ist im Verlauf der Zeit und in Abhängigkeit zur Konzentration dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

4.3.3 Einfluss reversibler Serinproteinase-Inhibitoren

Neben den synthetischen, irreversiblen Inhibitoren wurden ausgewählte reversible Proteinaseinhibitoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die intrazelluläre Tryptaseaktivität untersucht. Dazu wurden HMC-1 Zellen zunächst mit dem synthetischen, reversiblen Inhibitor Benzamidin, einem vergleichsweise unspezifischen Inhibitor Trypsin-ähnlicher Proteasen, inkubiert. Während der Inkubation mit Benzamidin konnte keine Hemmung der Tryptaseaktivität beobachtet werden, stattdessen stieg die Tryptaseaktivität nach einer Stunde deutlich an (Abb. 4.12a). Die Höhe des Anstiegs gegenüber der Kontrolle war von der

Benzamidin-Konzentration abhängig. Nach 360 min Inkubation mit 5 μM – 500 μM Benzamidin erreicht die Aktivität Werte von $125 \pm 5 \%$ bis $160 \pm 5 \%$ (Abb. 4.12b). Benzamidin bewirkt also anstelle einer Hemmung eine Steigerung der Aktivität (s. auch 4.4).

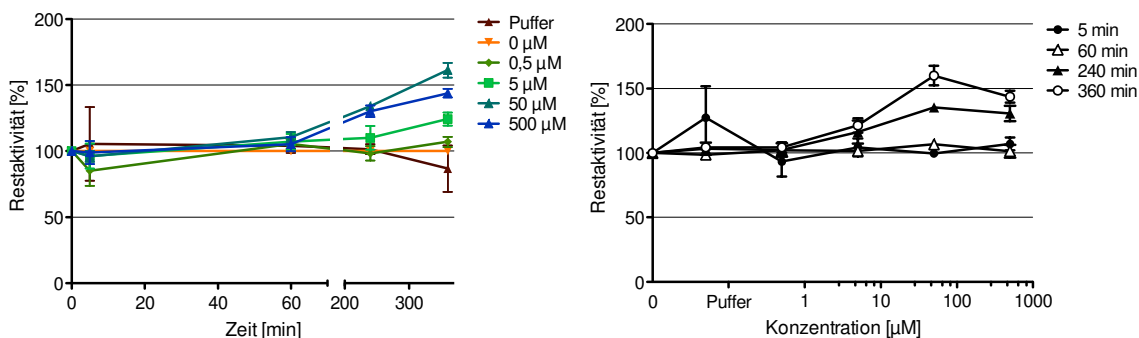


Abb. 4.12: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit Benzamidin normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle im Verlauf der Zeit und in Abhängigkeit von der Konzentration. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

Neben Benzamidin wurden die proteinergen Inhibitoren rLDTI und TdPI, die einzigen bisher bekannten, natürlich vorkommenden Inhibitoren der Tryptase [136, 141], verwendet. Als Kontrolle wurde Aprotinin (BPTI, boviner pankreatischer Trypsin Inhibitor), das strukturell mit TdPI verwandt ist (beides Kunitz-Typ Inhibitoren) aber Tryptase β nicht hemmt, verwendet.

Unter Inkubation mit 10 μM rLDTI nimmt die Tryptaseaktivität im zeitlichen Verlauf ab, nach 5 min liegt sie bei 70 %, nach 360 min bei $50 \pm 5 \%$ des Ausgangswertes; die maximal durch rLDTI mögliche Hemmung wird also erreicht [138]. Geringere rLDTI Konzentrationen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität (Abb. 4.13a). Im Vergleich dazu besitzt TdPI einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Tryptaseaktivität (Abb. 4.13b); diese wird durch 0,1 μM bzw. 1 μM TdPI bereits nach 5 min um $25 \pm 10 \%$ bzw. $65 \pm 2 \%$ gehemmt und bleibt über den gesamten Inkubationszeitraum konstant auf diesem Niveau. Die IC_{50} -Werte von rLDTI und TdPI liegen bei 10 μM und 0,4 μM , TdPI kann die Tryptaseaktivität also 25-mal besser hemmen als rLDTI. Im Gegensatz zu rLDTI und TdPI hat Aprotinin (Abb. 4.13c) keinen Einfluss auf die Tryptaseaktivität in HMC-1 Zellen. Diese Kontrolle zeigt, dass die Effekte von rLDTI und TdPI vermutlich auf ihre Fähigkeit zurückzuführen sind Tryptase β zu hemmen.

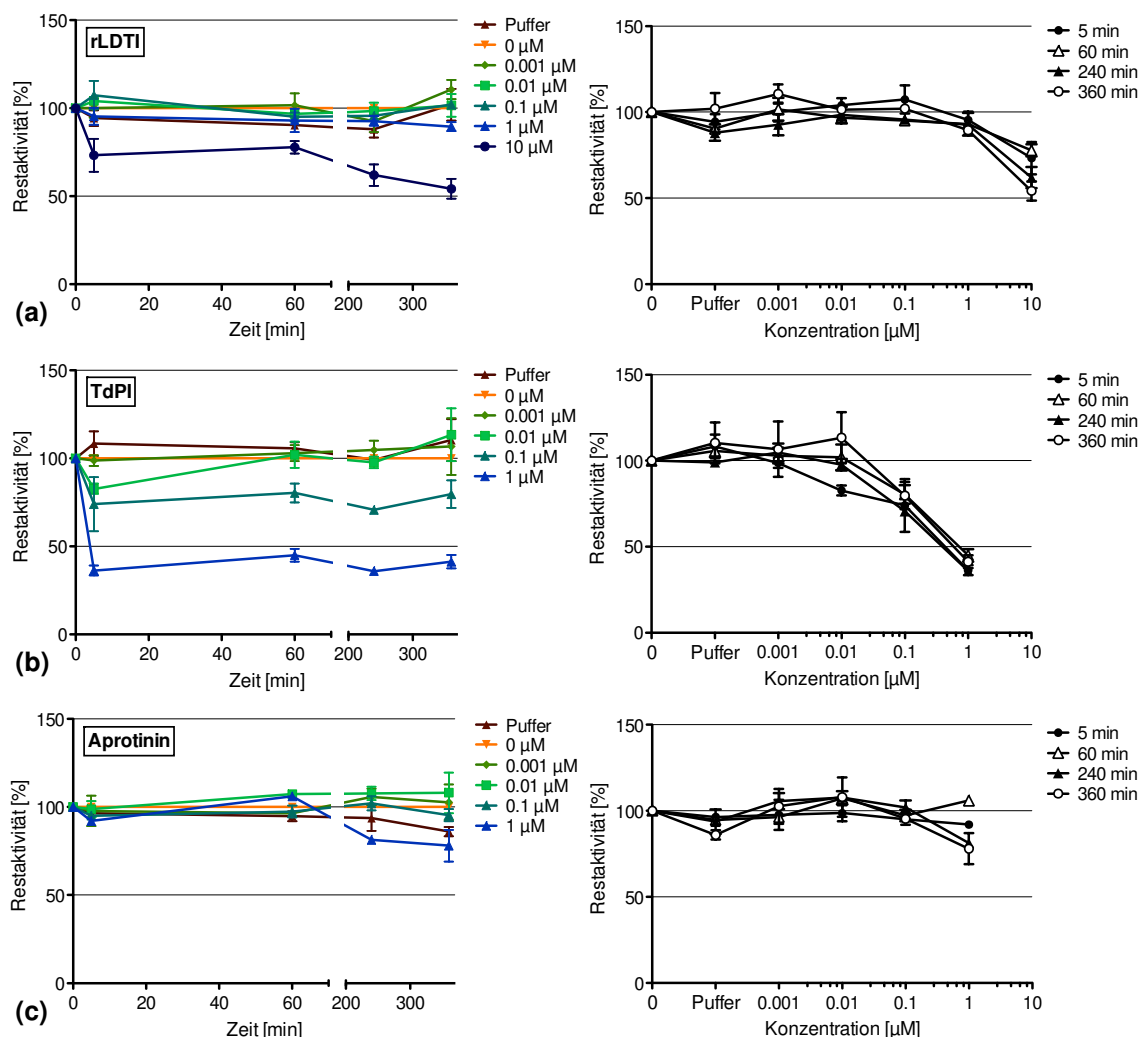


Abb. 4.13: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit **a)** rLDTI, **b)** TdPI und **c)** Aprotinin. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

Um zu prüfen welche Rolle die Affinität und die molekulare Masse eines Inhibitors spielen, wurde der Einfluss verschiedener TdPI-Varianten auf die Tryptaseaktivität in HMC-1 verglichen. Neben TdPI wurden TdPI-short, eine verkürzte Version des TdPIs (Lys21 – Gly75), sowie Fusionsproteine von TdPI und TdPI-short mit einem N-terminalen Thioreduktin His₆-Tag und einer TEV-Spaltungsstelle verwendet. Die Fusionsproteine sind ca. 17 kDa größer als die entsprechenden Inhibitoren (s. 3.2.1). Wie schon bei TdPI beobachtet, hat vor allem die Konzentration des Fusionsproteins einen Einfluss auf die Höhe der Hemmung und nicht die Inkubationszeit (Abb. 4.14b). Das TdPI Fusionsprotein erreicht in der eingesetzten Höchstkonzentration (3,9 μM) eine ähnliche maximale Hemmung wie TdPI (55 \pm 10 % bzw. 65 \pm 2 %) nach 360 min.

Die Effektivität des TdPI Fusionsproteins ist jedoch um den Faktor 10 geringer als die von TdPI, die IC_{50} -Werte betragen $4,6 \mu\text{M}$ bzw. $0,4 \mu\text{M}$.

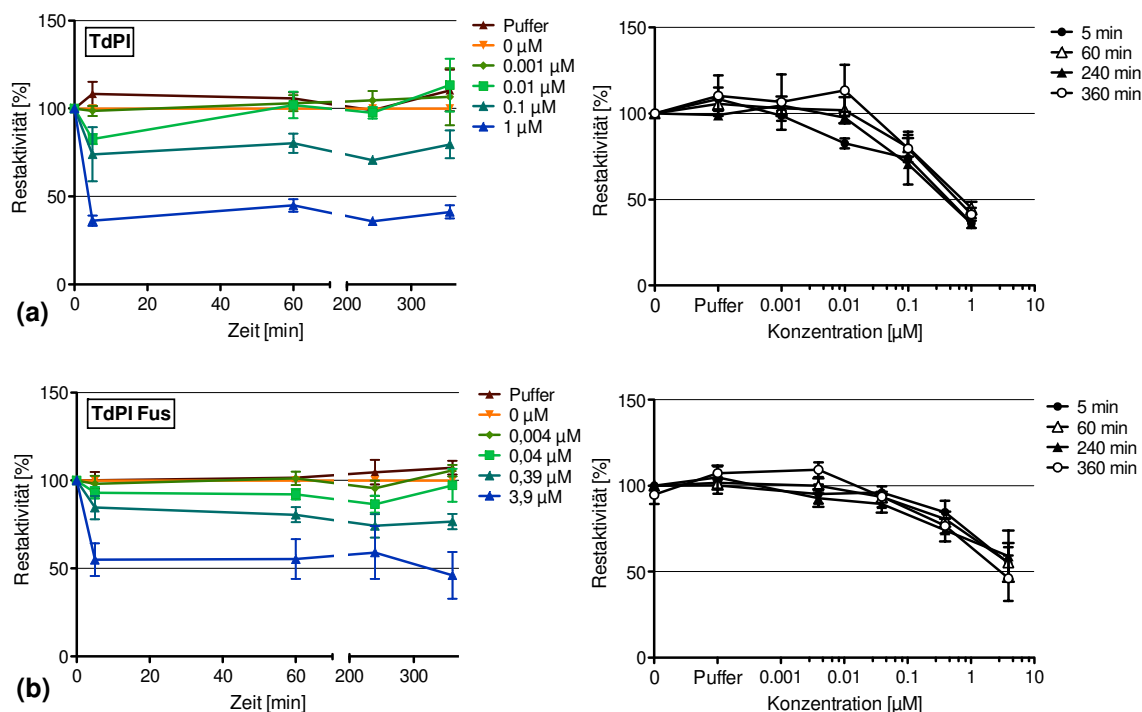


Abb. 4.14: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit **a)** TdPI und **b)** TdPI Fusionsprotein. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

TdPI-short, das im Gegensatz zu TdPI eine geringere Affinität zu Tryptase β besitzt (K_i $1,3 \mu\text{M}$ bzw. $0,2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$), und dessen Fusionsprotein hemmen die Tryptaseaktivität bei Konzentrationen bis $1 \mu\text{M}$ deutlich weniger als TdPI und dessen Fusionsprotein (Abb. 4.14a und b). Sowohl die Affinität zu Tryptase β als auch die Größe der Inhibitoren spielen also bei der Hemmung der intrazellulären Tryptase β eine Rolle.

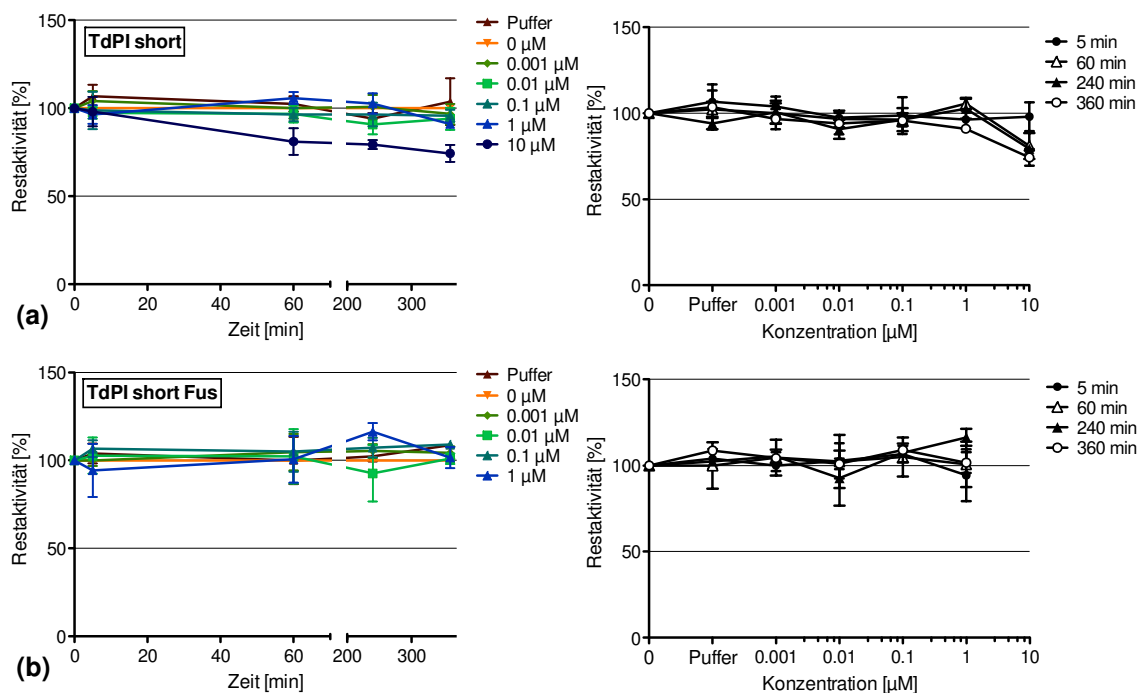


Abb. 4.15: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit **a)** TdPI short und **b)** TdPI short Fusionsprotein. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

4.3.4 Nachweis des Tryptaseinhibitors TdPI in HMC-1 Mastzellen

Um zu untersuchen, ob das TdPI Fusionsprotein in Zelllysaten nachweisbar ist, wurden Zellen, die mit Puffer oder 3,9 μ M TdPI Fusionsprotein über 6 h inkubiert worden waren, lysiert (Abb. 4.16). Das Fusionsprotein wurde mittels Western Blot über den im Fusionsprotein enthaltenen His₆-Tag nachgewiesen. Im Lysat von Zellen, die mit dem TdPI Fusionsprotein inkubiert worden waren, wird eine Bande bei ca. 32 kDa detektiert; diese Größe entspricht der errechneten Größe des TdPI Fusionsproteins (28,5 kDa).

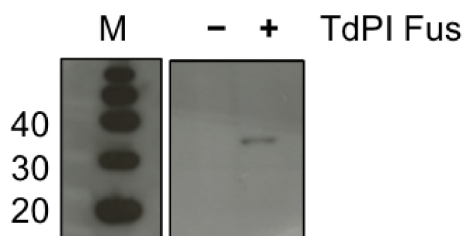


Abb. 4.16: Western Blot Analyse zum Nachweis des TdPI Fusionsproteins in HMC-1 Zellen. HMC-1 Zellen wurden ohne und mit 3,9 μ M TdPI Fusionsprotein über 6 h inkubiert und anschließend lysiert. In den Zelllysaten (je 70.000 Zellen) wurde der His₆-Tag mittels Western Blot nachgewiesen. M = Marker, Fus = Fusionsprotein.

Dagegen kann in dem Lysat, dessen Zellen mit Puffer inkubiert waren, keine Bande detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich das TdPI Fusionsprotein bereits vor der Lysatherstellung in den Zellen befunden hat, und somit auch die intrazellulär gespeicherte Tryptase hemmen kann.

4.3.5 Einfluss von TdPI auf die immunoreaktive Tryptase

Um den Einfluss des TdPI Fusionsproteins auf die intrazelluläre Tryptase-menge und Lokalisation der Protease zu untersuchen, wurden nach der Inkubation der Zellen mit bzw. ohne Inhibitor, Proben entnommen und Zytopräparate hergestellt (s. 3.4.6). Die intrazelluläre Tryptase wurde dann mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem Alexa Fluor 488 Farbstoff detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 4.17).

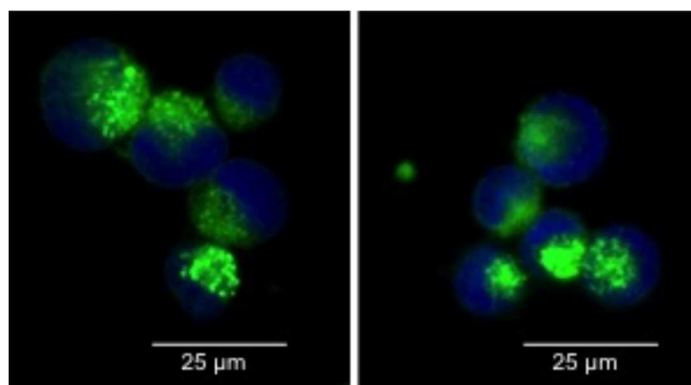


Abb. 4.17: Immunfluoreszenz-Färbung von HMC-1 Zellen. HMC-1 Zellen wurden sechs Stunden ohne (links) und mit (rechts) 10 µM TdPI Fusionsprotein inkubiert. Anschließend wurden Cytospins hergestellt, über Nacht kryofixiert, mit 0,05 % Tween permeabilisiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen Tryptase und einem Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Blau: Zellkerne (DAPI), grün: Tryptase

Die HMC-1 Mastzellen haben sowohl nach der Inkubation mit dem TdPI Fusionsprotein als auch ohne die annähernd gleiche Größe. Die Tryptase (grün) ist weiterhin in den Zellen enthalten, die Menge und die Granularität der HMC-1 Zellen erscheint unverändert, d. h. die Tryptase ist weiterhin in den Granula lokalisiert. Da zur Detektion der Tryptase der gleiche Primärantikörper verwendet wird wie für die Western Blot Experimente (s. Abb.4.7 und Abb. 4.21), kann zusätzlich von einer korrekten Spezifität des Antikörpers an Tryptase ausgegangen werden.

Die Abnahme der Tryptaseaktivität in den vorherigen Experimenten bei nun nachgewiesener gleichbleibender Tryptase-Immunoreaktivität zeigt, dass die Abnahme der Tryptaseaktivität tatsächlich auf einer Inhibition des Enzyms durch den Inhibitor beruht.

4.3.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Vitalität und Morphologie von HMC-1 Zellen

Zur Überprüfung der Vitalität und der Morphologie der Zellen wurden nach der sechsständigen Inkubation von HMC-1 Zellen mit Puffer bzw. Proteaseinhibitoren Proben entnommen und nach Färbung mit Trypan Blau die Vitalität und die orientierende Morphologie beurteilt (Abb.4.18). Nach der Inkubation mit Puffer beträgt die Vitalität $95 \pm 0,5$ % ($n=24$), die mit Inhibitor inkubierten Zellen zeigten eine Vitalität von 89 ± 3 % bis 99 ± 2 % ($n=2-5$). Zusammengefasst zeigte die Inkubation aller Inhibitoren eine Vitalität von 95 ± 4 %. Die Inkubation mit 10 mM PMSF wirkt jedoch toxisch, da >95 % der Zellen nicht mehr vital gewesen sind. Die orientierende Zellmorphologie ergab phasenkontrast-mikroskopisch keine Unterschiede. Es ist davon auszugehen, dass die Proben zur Herstellung der Zelllysate aus vitalen Zellen bestanden und die Inhibitoren die Morphologie der Zellen nicht wesentlich beeinflussen.

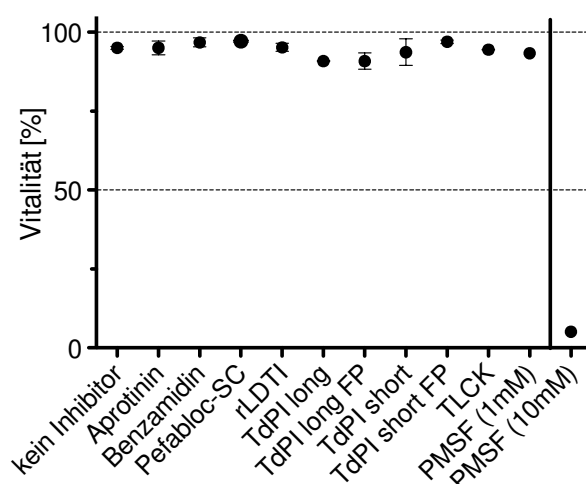


Abb. 4.18: Vitalität der HMC-1 Zellen nach Inkubation mit Proteaseinhibitoren. Nach 360 min wurden Proben entnommen, die Zellen mit Trypan Blau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es sind die Ergebnisse der eingesetzten Höchstkonzentrationen dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=2-24$.

4.4 Einfluss von Benzamidin auf die Tryptaseaktivität in HMC-1 Zellen

Nachdem am Ende der sechsständigen Inkubation von HMC-1 Zellen mit Benzamidin eine Steigerung der Tryptaseaktivität beobachtet worden war (s. Abb. 4.12) sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine Verlängerung der Inkubationszeit von 6 h auf 24 h sowie eine Steigerung der Benzamidin-Konzentration auf die Tryptaseaktivität bzw. die HMC-1 Zellen hat. Um die Vitalität der HMC-1 Zellen über 24 h zu gewährleisten, wurde die Anfangszell-dichte in der 48-Wellplatte von 2×10^6 Zellen pro ml (i. e. 1×10^6 Zellen pro Well) auf 5×10^5 Zellen pro ml (i. e. $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well) reduziert. Nach 5 min, 1 h, 4 h, 6 h, 9 h und 24 h wurden Proben entnommen, Zelllysate hergestellt und die Tryptaseaktivität gemessen (s. 3.4).

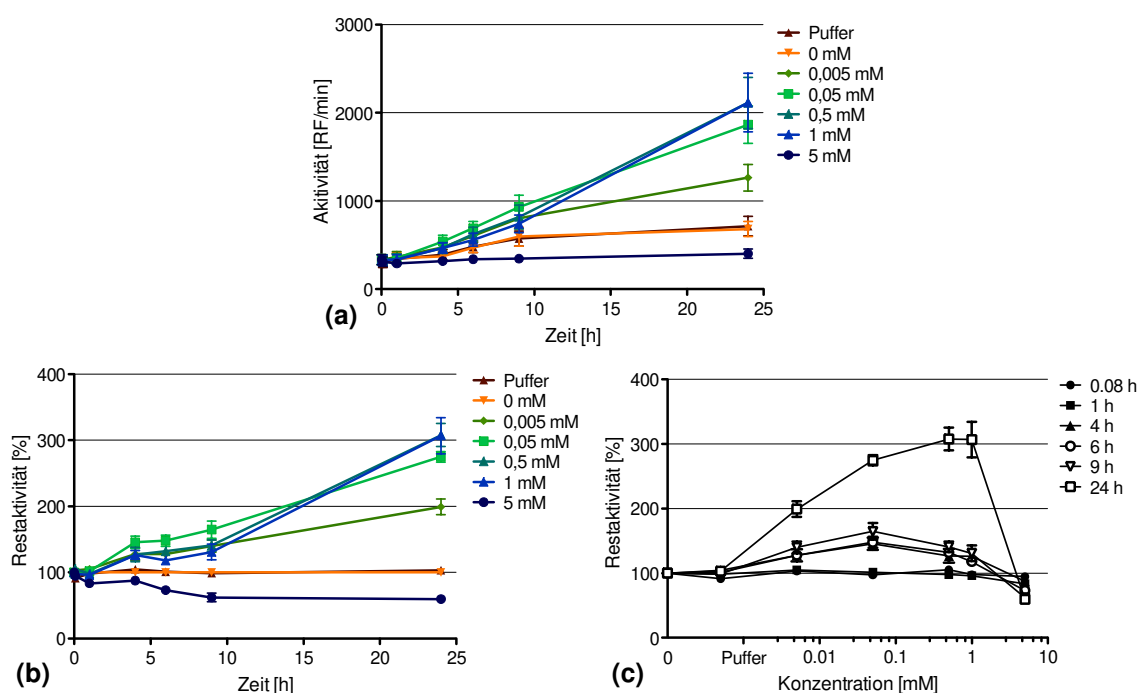


Abb. 4.19: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit Benzamidin. Die HMC-1 Zellen wurden in einer 48-Wellplatte mit unterschiedlichen Benzamidin-Konzentrationen (0 – 5 mM) inkubiert. Nach 0 – 24 h wurden Proben entnommen, Zelllysate hergestellt und die Aktivität gemessen. Mittelwert \pm SEM, $n=5$. **a)** Verlauf der Tryptaseaktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Tryptaseaktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender Benzamidin Konzentration auf die Aktivität der Tryptase.

Die Tryptaseaktivität stieg über den Inkubationszeitraum in allen Proben kontinuierlich an (Abb. 4.19a). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor erreicht die Aktivität mit 0,005 – 1 mM Benzamidin höhere Aktivitätswerte. Den größten Effekt beobachtet man mit 1 mM Benzamidin nach 24 h, die Tryptaseaktivität ist zu diesem Zeitpunkt 3-mal höher als die Aktivität der Kontrolle (Abb. 4.19b). Der EC₅₀-Wert liegt bei 0,005 mM nach 24 h (Abb. 4.19c). Die Aktivität nach Inkubation mit 5 mM Benzamidin liegt unter der Aktivität der Kontrolle und ist toxisch bedingt (vgl. Abb. 4.20). Die Ergebnisse bis 6 h sind vergleichbar mit den vorangegangenen Versuchen (s. Abb. 4.12).

Benzamidin steigert also die Tryptaseaktivität in den HMC-1 Zellen. Dabei ist der beobachtete Effekt umso größer, je höher die Benzamidin-Konzentration ist (ausgenommen toxische Konzentrationen) und je länger die Zellen mit dem Inhibitor inkubiert werden.

4.4.1 Toxizität von Benzamidin auf HMC-1 Zellen

In Lysaten von HMC-1 Zellen, die mit 5 mM Benzamidin inkubiert worden waren, war die Tryptaseaktivität gegenüber der Kontrolle vermindert (s. 4.4). Die Bestimmung der Toxizität mittels Trypan Blau zeigt in diesen Zellkulturen einen Anteil von $30 \pm 15 \%$ toter Zellen nach 24 h. Konzentrationen ≤ 1 mM Benzamidin und die Kontrollen haben in der Zellkultur einen Anteil von max. $8 \pm 4 \%$ bzw. $5 \pm 2 \%$ toter Zellen bis 24 h (Abb. 4.20a). Neben der erhöhten Toxizität von 5 mM Benzamidin, beobachtet man eine verminderte Proliferation in den betroffenen Zellkulturen (Abb. 4.20b). In den Kontrollen steigt die Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro ml, nach einem initialen Abfall auf $3,5 \times 10^5$ Zellen pro ml nach 6 h, auf $5,5 \times 10^5$ Zellen pro ml an. Unter 5 mM Benzamidin fällt die Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro ml auf $3,5 \times 10^5$ Zellen pro ml nach 6 h ab und stagniert auf diesem Niveau über 24 h. Die Zellen, die ≤ 1 mM Benzamidin ausgesetzt waren, proliferierten genauso gut wie die Kontrollen und erreichten eine Zelldichte von $5,5 \times 10^5$ Zellen pro ml nach 24 h.

Die Toxizitätsgrenze von Benzamidin liegt also zwischen 1 mM und 5 mM und wirkt sich sowohl auf die Proliferation der Zellen als auch auf die Vitalität der Zellen aus. Des Weiteren bewirkt Benzamidin keine gesteigerte Proliferation der HMC-1 Zellen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die gegenüber den Kontrollen gesteigerte Tryptaseaktivität im Zelllysate aus einer Steigerung der Tryptase pro Zelle stammt.

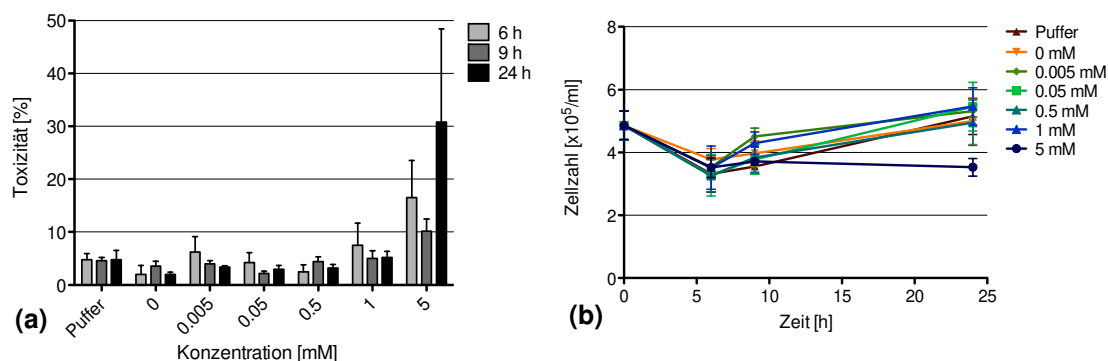


Abb. 4.20: **a)** Toxizität von Benzamidin auf HMC-1 Zellen in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit. Mittelwert \pm SEM, $n=5$. **b)** Verlauf der Zelldichte der HMC-1 Zellen während der Inkubation mit Benzamidin (0 – 5mM) in 48-Well Platten über 24 h. Mittelwert \pm SEM, $n=5$.

4.4.2 Einfluss von Benzamidin auf immunoreaktive Tryptase in HMC-1 Zellen

Um zu differenzieren, ob die gesteigerte Tryptaseaktivität aus einer gesteigerten enzymatischen Aktivität der Tryptase per sé oder einer erhöhten Tryptasemenge pro Zelle stammt, wurden bei drei verschiedenen Versuchen Aliquots aus Zelllysaten (ca. 25.000 Zellen), die zuvor in der Aktivitätsmessung verwendet worden waren, entnommen. Diese wurden dann zu Western Blot-Proben verarbeitet und ein Western Blot zur Detektion der Tryptasemenge angefertigt (s. 3.4.5).

Abb. 4.21 zeigt den Western Blot, die Probenpaare sind mit 1, 2, 3 gekennzeichnet. Ein Probenpaar besteht jeweils aus einem Zelllysate der Kontrolle (–) und einem Zelllysate aus Zellen, die mit 500 μ M Benzamidin inkubiert worden waren (+). Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Bandenstärke wurde mittels Densitometrie semiquantitativ ausgewertet. Die Auswertung der Banden von β -Aktin zeigt innerhalb eines Probenpaares weitgehend übereinstimmende Ergebnisse; das Probenpaar aus Versuch 3

enthält jedoch deutlich weniger Gesamtprotein als die anderen Proben, hier wurden weniger Zellen aufgetragen.

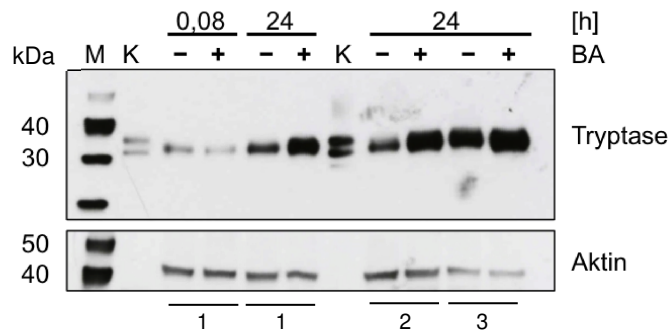


Abb. 4.21: Western Blot-Analyse von HMC-1 Zelllysaten (1,2,3) mit Darstellung des Tryptasegehalts (oben) und β -Aktin (unten) zur Kontrolle des Proteingehalts der Proben. HMC-1 Zellen wurden ohne bzw. mit 500 μ M Benzamidin (BA) über 24 h inkubiert ($n=3$), Zelllysate hergestellt und der Western Blot angefertigt. M=Marker, K=Kontrolle: Tryptase β (20 bzw. 50 ng).

Die densitometrische Auswertung des Tryptasegehalts zeigt, dass die Tryptasemenge nach 5 min (0,08 h) in beiden Proben gleich ist. Nach 24 h kann in allen Proben ein höherer Tryptasegehalt pro Zelle nachgewiesen werden (gleicher bzw. geringerer β -Aktin Gehalt) im Vergleich zum Startzeitpunkt. In allen drei Versuchen enthalten die Benzamidin-Proben nach 24 h deutlich mehr Tryptase pro Zelle als die dazugehörigen Kontrollen.

Der Western Blot zeigt, dass Zellen, die mit Benzamidin inkubiert wurden, verglichen mit den Kontrollen bei gleicher Zellzahl nach 24 h einen höheren Tryptasegehalt besitzen. Die zuvor nachgewiesene, höhere Tryptaseaktivität in den HMC-1 Zelllysaten nach Inkubation mit Benzamidin beruht also auf einem höheren Tryptasegehalt pro Zelle und nicht auf einer gesteigerten enzymatischen Aktivität der Tryptase-Tetramere.

4.5 Einfluss von Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Aktivität von Cathepsin C und Tryptase β in HMC-1

Tryptase β wird als Zymogen synthetisiert, die Aktivierung erfolgt intrazellulär vor der Speicherung in Granula durch Abspaltung des Propeptids u. a. durch die Cathepsine C, L und B. Damit sind neben Tryptaseinhibitoren auch Cathepsininhibitoren potenziell geeignet, um die Tryptaseaktivität innerhalb der Mastzelle zu hemmen. Im Folgenden wurde deshalb der Effekt von Cathepsin C-Inhibitoren untersucht. Alle Versuche mit Cysteinprotease-Inhibitoren wurden im 96-Well Mikrotiterplatten-Format über 48 h durchgeführt (s. 4.2).

4.5.1 Einfluss von E64 auf die Cathepsin C-Aktivität

Um den Einfluss des irreversiblen Inhibitors E64, der relativ unspezifisch Cysteinproteasen einschließlich der Cathepsine C, L und B hemmt, auf die Aktivität von Cathepsin C und Tryptase β in HMC-1 zu untersuchen, wurden HMC-1 Zellen mit 0 – 100 μM E64 über 48 h in 96-Wellplatten inkubiert. Nach 0, 6, 24, 30 und 48 h wurden Proben entnommen, Zelllysate hergestellt und die Cathepsin C- und Tryptaseaktivität gemessen (s. 3.4.4).

Im Inkubationszeitraum stieg die Cathepsin C-Aktivität in den Kontrollen kontinuierlich von 1200 ± 100 RF/min auf 4300 ± 1000 bzw. 3500 ± 800 RF/min an (Abb. 4.22a). Der Verlauf der Aktivität, der aus experimentellen Gründen auf die Pufferkontrolle normiert wurde, zeigt, dass 100 μM E64 die Cathepsin C-Aktivität ab 24 h vollständig hemmt. 10 μM E64 hemmt sie um $75 \pm 5 \%$ und $60 \pm 15 \%$ nach 30 bzw. 48 h (Abb. 4.22b). In einer Konzentration von 1 μM hat E64 keinen Effekt. Der IC_{50} -Wert beträgt damit rund 4,6 μM nach 24 h (Abb. 4.22c).

Die Ergebnisse zeigen, dass E64 die Cathepsin C-Aktivität unter den zuvor genannten Bedingungen hemmt. Bei einer Konzentration von 100 μM kann eine vollständige Hemmung der zellulären Cathepsin C-Aktivität nach 24 h erzielt werden, ohne dass die Proliferation der Zellen beeinflusst wird oder sich toxische Effekte zeigen.

4.5.2 Einfluss von E64 auf die Tryptaseaktivität

Neben der Cathepsin C-Aktivität wurde ebenfalls die Tryptaseaktivität aus denselben Zelllysaten bestimmt, um die Frage zu klären, ob die Cathepsin C-Hemmung Auswirkungen auf die Aktivität der Tryptase hat. Die Tryptaseaktivität stieg in allen Proben, außer unter 100 μ M E64, von ungefähr 700 RF/min auf 1600 – 1900 RF/min an. Die mit 100 μ M E64 inkubierten Proben stagnierten auf einem Aktivitätsniveau von ca. 900 RF/min über den gesamten Inkubationszeitraum (Abb. 4.23a). Nach der Normierung auf die Kontrolle zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt resultiert daraus eine Hemmung der Tryptaseaktivität um 50 ± 5 % (Abb. 4.23b). Die Cathepsin-Inhibition durch E64 verhindert demnach die Zunahme der Tryptaseaktivität über die Zeit, die bereits vorhandene Aktivität zum Startzeitpunkt bleibt jedoch erhalten.

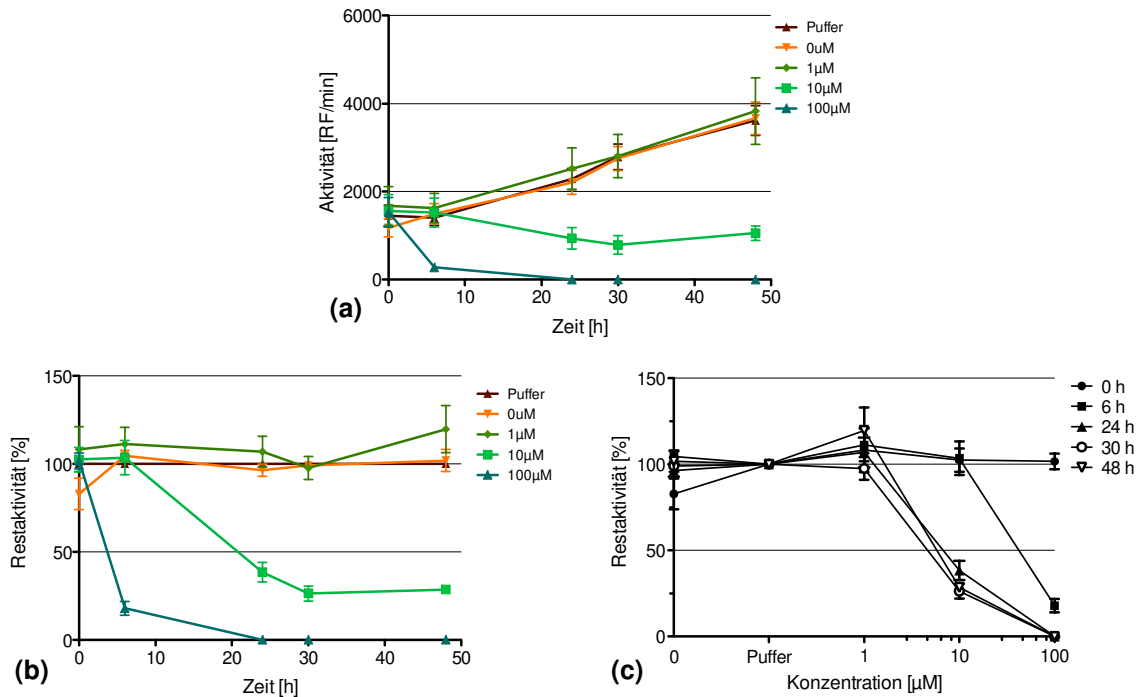


Abb. 4.22: Verlauf der Cathepsin C-Aktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit E64. Die HMC-1 Zellen wurden in einer 96-Wellplatte mit 0 – 100 µM E64 inkubiert. Nach 0 – 48 h wurden Proben entnommen, Zelllysate hergestellt und die Aktivität gemessen. Mittelwert \pm SEM, $n=3$. **a)** Verlauf der Cathepsin C-Aktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Cathepsin C-Aktivität normalisiert auf die Aktivität der Pufferkontrolle zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender E64 Konzentrationen auf die Cathepsin C-Aktivität.

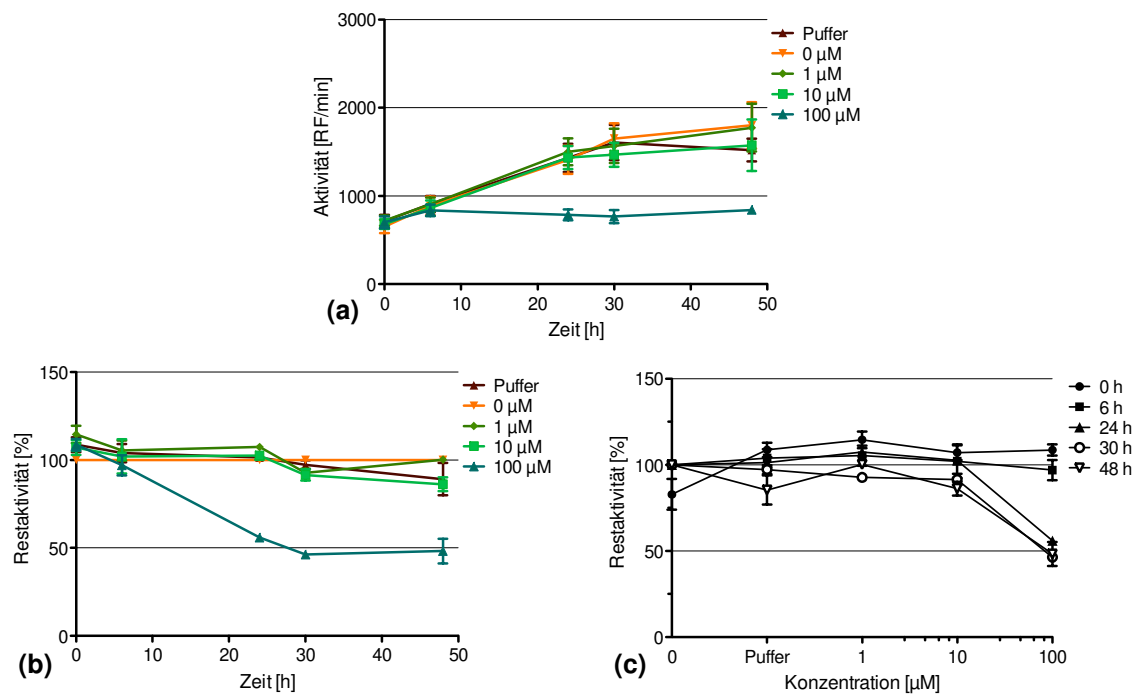


Abb. 4.23: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation von HMC-1 Zellen mit E64. Mittelwert \pm SEM, $n=3$. **a)** Verlauf der Tryptaseaktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Tryptaseaktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender E64-Konzentrationen auf die Tryptaseaktivität.

4.5.3 Einfluss von HR-57 auf die Cathepsin C-Aktivität

Im Vergleich zu dem unspezifischen Cysteinprotease-Inhibitor E64 ist HR-57 ein vergleichsweise selektiver Cathepsin C-Inhibitor, der zusätzlich zu seiner hohen Affinität zu Cathepsin C ($k_2/K_i = 56000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) eine hohe Selektivität zu Cathepsin C gegenüber Cathepsin L aufweist (s. 3.2.1).

Die Cathepsin C-Aktivität ist bereits nach 5 min Inkubation mit Konzentrationen von 1 – 50 μM HR-57 ($n=1-3$) um 45 – 95 % gehemmt. Geringere Konzentrationen haben keinen Effekt auf die Aktivität. Die Inhibition bleibt bis zu 6 h stabil, danach nimmt die prozentuale Hemmung der Aktivität in allen Proben kontinuierlich ab (s. Abb. 4.24b), da die Cathepsin C-Aktivität im Verlauf wieder annähernd parallel zu den Kontrollen ansteigt (s. Abb. 4.24a).

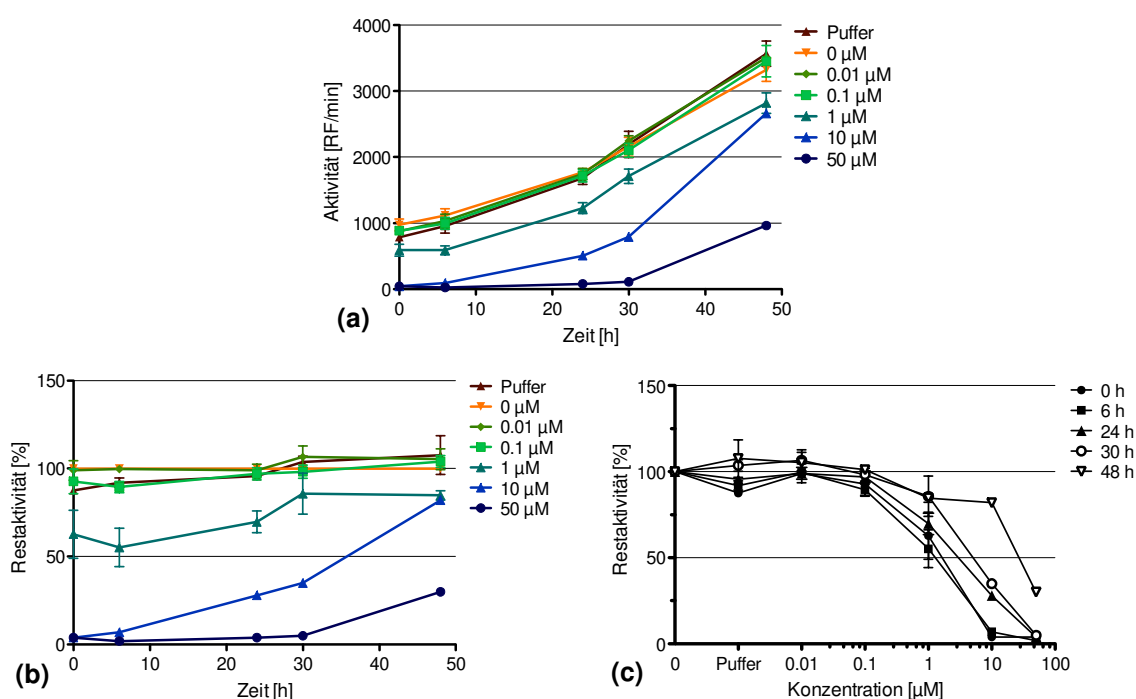


Abb. 4.24: Verlauf der Cathepsin C-Aktivität während der Inkubation der HMC-1 Zellen mit 0 – 50 μM HR-57. Mittelwert \pm SEM, $n=3$ bei Konzentrationen $<10 \mu\text{M}$, $n=1$ bei 10 μM + 50 μM . **a)** Verlauf der Cathepsin C-Aktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Cathepsin C-Aktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender HR-57 Konzentrationen auf die Cathepsin C-Aktivität.

Die Inhibition beträgt mit 1 μM $45 \pm 15 \%$ und $20 \pm 3 \%$, mit 10 μM $\geq 95 \%$ und $20 \pm 4 \%$ nach 6 bzw. 48 h. 50 μM hemmen die Aktivität $\geq 95 \%$ und 70 % nach 30 bzw. 48 h. Der IC_{50} -Wert liegt bei 1,2 μM nach 6 h (Abb. 4.24c).

HR-57 hemmt Cathepsin C also schneller und mit höherer Affinität als E64 (IC_{50} 1,2 bzw. 4,6 μM), allerdings bleibt die Inhibition im Gegensatz zu E64 nicht über den gesamten Inkubationsraum stabil.

4.5.4 Einfluss von HR-57 auf die Tryptaseaktivität

Die intrazelluläre Tryptaseaktivität stieg in den Kontrollen und den Zellen, die mit HR-57 inkubiert worden waren, kontinuierlich an (Abb. 4.25a). Während der Inkubation mit 50 μM HR-57 steigt die Tryptaseaktivität zwischen 6 – 30 h langsamer an als in den Kontrollen, was zu einer tendenziellen Inhibition in diesem Zeitraum von ca. 20 % führt (Abb. 4.25b). Nach 48 h war keine Inhibition mehr sichtbar, was durch die Instabilität des Inhibitors im Kultivierungsmedium und die abnehmende Cathepsin C-Hemmung nach >30 h bedingt sein kann.

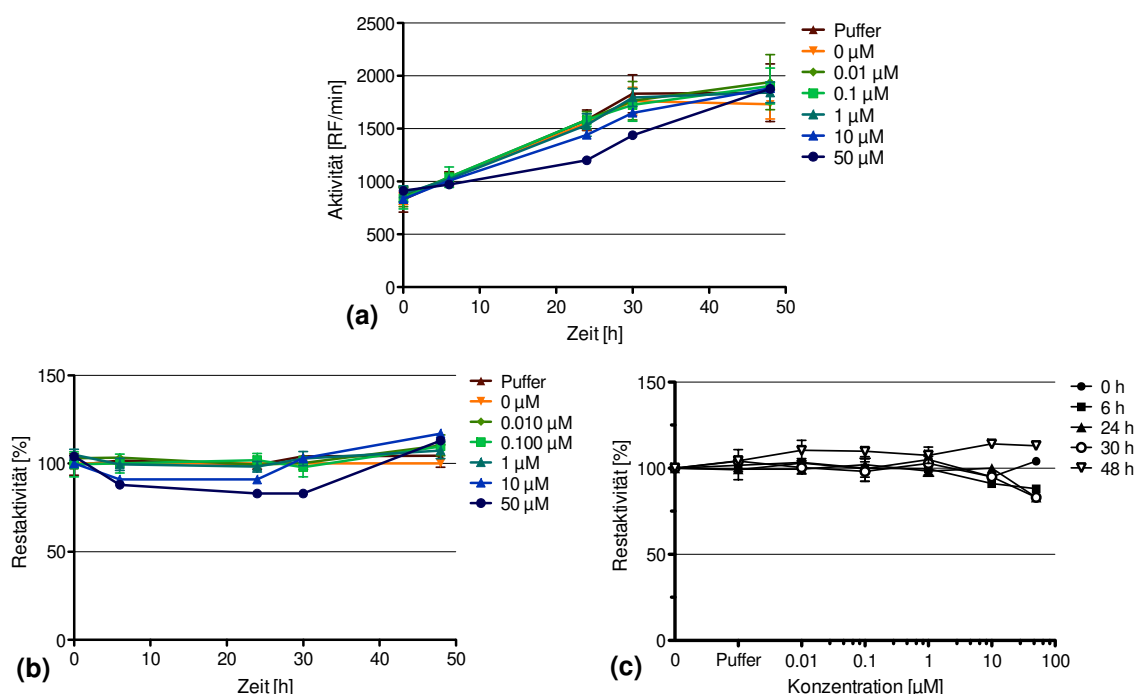


Abb. 4.25: Verlauf der Tryptaseaktivität während der Inkubation der HMC-1 Zellen mit HR-57. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, 10 μM + 50 μM $n=1$. **a)** Verlauf der Tryptaseaktivität (Absolutwerte). **b)** Verlauf der Tryptaseaktivität normalisiert auf die Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt. **c)** Effekt steigender HR-57 Konzentrationen auf die Tryptaseaktivität.

5 Diskussion

Neben ihrer Funktion in der angeborenen und erworbenen Immunität tragen Mastzellen zu diversen entzündlichen und allergischen Erkrankungen, wie z. B. dem Asthma oder der Arthritis, bei. Es wird angenommen, dass in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen Tryptase β , die mengenmäßig dominierende Protease der Mastzelle, eine zentrale Rolle spielt. Sie stellt daher einen interessanten pharmakologischen Ansatzpunkt zur Beeinflussung der Mastzellfunktion dar. Bislang wird angenommen, dass Tryptase β nach der Degranulation der Mastzelle ihre Wirkung primär im Extrazellulärraum entfaltet. Tryptaseinhibitoren wurden bereits mit vielversprechenden Ergebnissen in klinischen Studien getestet [97, 145, 153]. Tryptase β ist jedoch schon in den Granula in aktiver Form gespeichert. Neuere Studien zeigen nun, dass Tryptase β potenziell intrazelluläre Funktionen, wie die Spaltung von Core-Histonen im Nukleus, hat und somit zur Zellhomöostase beiträgt [105]. Bisher ist weitgehend unbekannt, wo Tryptaseinhibitoren mit Tryptase β interagieren. Insbesondere ist unbekannt, ob diese Inhibitoren auch die in der Mastzelle gespeicherte, aktive Tryptase β hemmen und damit andere Effekte auf die Mastzellphysiologie haben können.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Quantifizierung der intrazellulären Tryptase β in Mastzellen entwickelt. Mit Hilfe dieser Methode wurde der Einfluss verschiedener Tryptaseinhibitoren auf die intrazelluläre Tryptase β in HMC-1 Mastzellen und die Auswirkungen der Hemmung auf die Mastzelle allgemein untersucht.

5.1 Etablierung der Methode

5.1.1 Kultivierung der HMC-1 Zelllinie

Zur Untersuchung von Mastzellen werden derzeit primäre murine und humane Mastzellen sowie Zelllinien eingesetzt [12, 156, 157]. Um die intrazelluläre Tryptase β und die Auswirkungen von Tryptaseinhibitoren zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit HMC-1 Zellen, eine gut charakterisierte Mastzell-Zelllinie, verwendet. Der Vorteil dieser Zelllinie liegt in ihrer guten Kultivierbarkeit. Die Verdopplungsrate beträgt nur ca. 48 h, sodass reproduzierbar große und homogene Zellpopulationen erzeugt werden können.

Ein Nachteil der HMC-1 Zelllinie ist allerdings, dass sie relativ undifferenziert ist und relativ geringe Mengen an Tryptase β enthält [27, 158]. Differenzierte Mastzellen können jedoch nur aus menschlichem oder tierischem Gewebe isoliert werden und sind schwierig und teuer in ihrer Kultivierung. Außerdem existieren deutliche Unterschiede zwischen Spendern und insbesondere Spezies [159, 160]. Für die geplanten Versuche waren hohe Zellzahlen notwendig, so dass die HMC-1 Zelllinie aufgrund der hohen Proliferationsrate eine gute und kostengünstige Alternative zur Kultivierung von differenzierten Mastzellen darstellt. Außerdem stehen mittlerweile verschiedene HMC-1 Subtypen mit unterschiedlicher Differenzierung zur Verfügung [29], die in dieser Arbeit verwendet wurden (s. 4.1.6).

5.1.2 Herstellung von HMC-1 Zelllysaten

Um Tryptase β mit möglichst hoher Wiederfindung in HMC-1 zu quantifizieren wurde zunächst der Prozess der Lysatherstellung optimiert. Es wird davon ausgegangen, dass Tryptase β in aktiver Form in den Granula von Mastzellen gespeichert wird [39]. Es ist prinzipiell möglich, mit relativ aufwändigen Methoden und hohen Zellzahlen, Mastzellgranula zu isolieren und diese zu lysieren, um Tryptase β zu messen [161]. Auf diese Weise ist weitgehend auszuschließen, dass endogene, zytoplasmatische Inhibitoren nachfolgende Analysen der Tryptaseaktivität beeinflussen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind allerdings keine endogenen Inhibitoren für Tryptase β in Mastzellen des Menschen beschrieben [162]. Daher wurden zur Bestimmung der intrazellulären Tryptase Lysate aus der Gesamtzelle verwendet.

Zur Lysatherstellung wurden verschiedene, auch in der Literatur verwendete Lysepuffer hinsichtlich ihrer Effektivität verglichen [39, 163]. Die Wiederfindung aktiver Tryptase β ist deutlich von der Zusammensetzung des Lysepuffers abhängig. Die höchste Wiederfindung von aktiver Tryptase β zeigt sich in einem Puffer mit niedrigem pH-Wert, NaCl und Heparin. Die nachfolgenden Präparationsschritte wie Ultraschallbehandlung oder der Zusatz von Detergenz erhöhten die Tryptaseaktivität im Zelllysat nicht wesentlich (s. 4.1.3). Diese Ergebnisse entsprechen auch den Eigenschaften des enzymatisch aktiven Tryptase β -Tetramers, das unter diesen Bedingungen vergleichsweise stabil ist [164-166].

5.1.3 Analyse der tryptischen Aktivität im Zelllysats

Thrombin besitzt ein ähnliches Aktivitätsspektrum wie Tryptase β und kommt in großen Mengen im Serum vor. Daher ist Thrombin ein möglicher Störfaktor während der Messung der tryptischen Aktivität im Zelllysats. Um zu verifizieren, dass die tryptische Aktivität im Zelllysats auf die Aktivität der Tryptase β zurückzuführen ist, wurde das Hemmspektrum mit dem von rekombinanter Tryptase β sowie Thrombin verglichen. Dafür wurden Inhibitoren von Tryptase β (z. B. rLDTI), Thrombin (z. B. Antithrombin) und anderen Protease-Klassen (z. B. EDTA) verwendet [138, 167, 168].

Der Serinprotease-Inhibitor Pefabloc SC und die für Tryptase β relativ spezifischen Inhibitoren Byk 296172 und rLDTI hemmen die Aktivität im Zelllysats um 90, 97 und 50 %. Das als Negativkontrolle eingesetzte Aprotinin hemmt dagegen weder die Aktivität des rekombinanten Enzyms noch die Aktivität im Zelllysats [43]. Der prozentuale Anteil der Inhibition im Zelllysats stimmt damit weitgehend mit der Inhibition von rekombinanter Tryptase β überein. Thrombin hingegen hat ein deutlich abweichendes Inhibitionsspektrum: Hirudin und Antithrombin hemmen Thrombin >95 %, wohingegen Pefabloc SC, rLDTI und Byk 296172 <20 % der enzymatischen Aktivität inhibieren.

Antithrombin hemmt die Aktivität im Zelllysats um ca. 20 %. Eine Verunreinigung mit Thrombin aus dem Kultivierungsmedium wird dennoch nahezu ausgeschlossen, da Hirudin als spezifischer Thrombininhibitor die Aktivität im Zelllysats nicht hemmt (<5 %). Darüber hinaus war in den Waschpuffern, die als Kontrolle mitgeführt wurden, keine Thrombin-Aktivität nachweisbar. Die Inhibition durch Antithrombin lässt sich dadurch erklären, dass Antithrombin das im Test vorhandene Heparin bindet und so die Tryptaseaktivität durch Destabilisierung des Tetrameres reduziert [169].

Diese Ergebnisse zeigen, dass der überwiegende Teil (>90 %) der tryptischen Aktivität im Zelllysats auf Tryptase β zurückzuführen ist. Die Restaktivität von 5 – 10 % kann durch eine inkomplette Hemmung von Tryptase β z. B. durch eine Kompartimentalisierung des Enzyms bei der Präparation der Zelllysate zustande kommen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass eine oder mehrere andere Proteasen für die Restaktivität verantwortlich sind. Für die weiterführenden Versuche ist dieser geringe Anteil jedoch nicht relevant.

5.1.4 Quantifizierung der Tryptase in HMC-1 Subzelllinien

Um die Eignung der verschiedenen HMC-1 Subzelllinien für die geplanten Experimente zu überprüfen, wurde zunächst die intrazelluläre Tryptaseaktivität verglichen. Die Mehrzahl der Subzelllinien, einschließlich der Originalzelllinie, haben einen enzymkinetisch bestimmten Tryptasegehalt von 0,03 – 0,12 pg/Zelle. Dieser Wert stimmt weitgehend mit dem Tryptasegehalt aus früheren Publikationen (0,01 – 0,05 pg/Zelle) überein [28, 170]. Für die Subzelllinie HMC-1.2 wurde in dieser Arbeit erstmalig der Tryptasegehalt bestimmt, der bei $1,1 \pm 0,2$ pg/Zelle liegt. Somit enthalten HMC-1.2 deutlich mehr Tryptase als die anderen Subzelllinien, was der höheren Differenzierung dieser Subzelllinie entspricht [29]. Trotzdem besitzen alle HMC-1 Subzelllinien deutlich weniger Tryptase β als ausdifferenzierte Mastzellen (~ 30 pg/Zelle). Grundsätzlich sind alle Subzelllinien dazu geeignet, die intrazelluläre Tryptase zu untersuchen, da in allen die Tryptaseaktivität gut reproduzierbar bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurden die Originalzelllinie sowie aufgrund des höheren Tryptasegehalts die HMC-1.2 Subzelllinie verwendet.

Zur Validierung der enzymkinetischen Quantifizierung wurde der intrazelluläre Tryptasegehalt ebenfalls mittels Western Blot bestimmt. Die Ergebnisse beider Bestimmungsmethoden korrelieren. Subzelllinien höherer Differenzierung (z. B. HMC-1.2) enthalten eine höhere Tryptasemenge pro Zelle als Subzelllinien niedrigerer Differenzierung (s. Abb. 4.7). Jedoch liegt der Tryptasegehalt pro Zelle bei der enzymkinetischen Quantifizierung 4 – 15-fach niedriger als der über die Immunoreaktivität bestimmte Wert. Im Gegensatz zu der enzymkinetischen Quantifizierung detektiert der im Western Blot verwendete polyklonale Antikörper gegen Tryptase β auch inaktive Formen, wie Tryptase β -Monomere und das Zymogen. Die Bestimmung des Tryptasegehalts über die Aktivität detektiert dahingegen nur aktive Tryptase β -Tetramere, sodass die Ergebnisse von der Stabilität des Tetramers im Zelllysats abhängen (s. 4.1.3). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass in HMC-1 ein Teil der produzierten Tryptase β als Zymogen intrazellulär vorliegen und nicht, wie es bei differenzierten Mastzellen angenommen wird [145], direkt auf dem Weg in die Granula aktiviert werden. Allerdings ist die densitometrische Auswertung des Western Blots lediglich eine semi-quantitative Methode [171], eine Verifizierung mittels einer quantitativen Methode, z. B. mittels ELISA, ist daher notwendig.

Durch die Charakterisierung hinsichtlich des Tryptasegehaltes stehen nun HMC-1 Subzelllinien für verschiedene Versuchsanforderungen zur Verfügung. Insbesondere für Langzeitversuche, in denen eine geringere Zelldichte verwendet werden muss, um eine ausreichende Vitalität zu gewährleisten, ist die HMC-1.2 Subzelllinie aufgrund des höheren Tryptasegehalts eine gute Alternative zu der Originalzelllinie.

5.1.5 Überführung der Methode auf das 96-Well Mikrotiterplatten-Format

Zur Vereinfachung der Zellverarbeitung und gleichzeitigen Steigerung der Probenanzahl wurde die Methodik von der 48-Wellplatte mit Verarbeitung in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in 96-Well Mikrotiterplatten überführt. Für diese Versuche wurde die HMC-1.2 Subzelllinie eingesetzt, da durch den höheren Tryptasegehalt eine geringere Zelldichte verwendet werden konnte ($3,3 \times 10^5$ Zellen pro ml vs. 2×10^6 Zellen pro ml). Aufgrund der hohen Sensitivität des Tryptase-Assays wurde trotz der relativ geringen Zelldichte eine ausreichende Tryptaseaktivität gemessen (ca. 800 RF/min). Außerdem konnte durch die geringere Zelldichte die Inkubationszeit auf 48 h verlängert werden, ohne dass die Vitalität der Zellen beeinträchtigt war (Vitalität >95 %, s. 4.2.2).

Die Weiterentwicklung der 96-Well Methodik erbrachte eine deutliche Reduzierung der benötigten Arbeitsschritte, Substanzmengen und Zeit. Der Materialverbrauch war allerdings weiterhin relativ hoch, da pro Versuch – einschließlich Proliferations- und Toxizitätsbestimmung – sieben 96-Wellplatten benötigt wurden. Der Variationskoeffizient beider Methoden ist ähnlich (6,8 % bzw. 7,6 %); insbesondere bei der enzymkinetischen Messung stieg die Anzahl der Ausreißer (>10 % VK), die durch längere Übung wieder reduziert werden konnte. Im Einzelnen wurde dieser Umstand nicht mehr quantifiziert (vgl. Tab. 4.1 und 4.2).

5.2 Inhibitorstudien

5.2.1 Inhibition der intrazellulären Tryptaseaktivität in HMC-1

Um den Einfluss verschiedener Proteinase-Inhibitoren auf die intrazellulär gespeicherte Tryptase β zu untersuchen, wurden HMC-1 Zellen mittels der entwickelten Methoden für bis zu 48 h mit Inhibitoren inkubiert, Zelllysate hergestellt und die verbleibende Aktivität von Tryptase β enzymkinetisch bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Tryptaseaktivität durch Zugabe von Inhibitoren in das Kultivierungsmedium der Zellen reduziert wird. Das Ausmaß der Inhibition ist dabei von der Konzentration und Stabilität des Inhibitors im Kultivierungsmedium, der Affinität zu Tryptase (K_i) sowie von der Inkubationszeit abhängig. Neben niedermolekularen Inhibitoren wie Pefabloc SC, TLCK und PMSF hemmen auch proteinerge, reversible Inhibitoren wie rLDTI oder TdPI die Tryptaseaktivität. Die gemessenen maximalen Inhibitionen stimmen dabei mit den beschriebenen maximalen Inhibitionen für rekombinante Tryptase β überein [137, 141]. Als Negativkontrolle wurde Aprotinin verwendet, das Tryptase β nicht hemmt [106]; auch in diesem Modellsystem konnte wie erwartet keine signifikante Hemmung beobachtet werden.

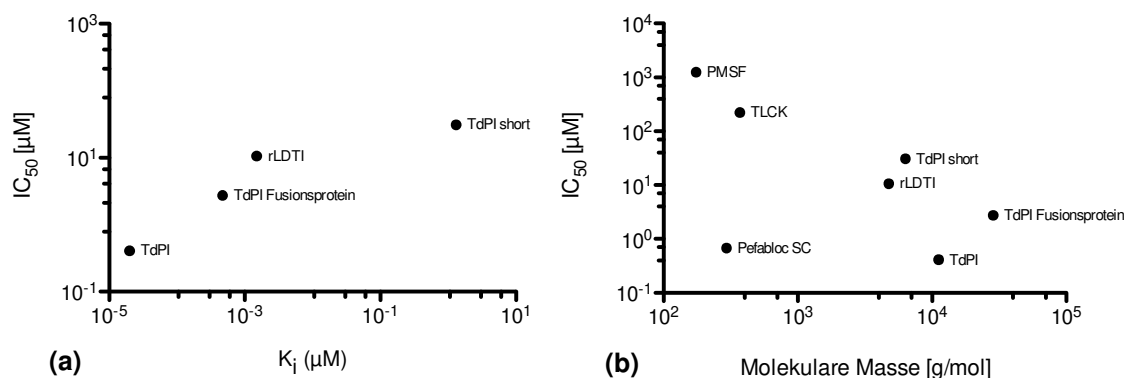


Abb. 5.1: Korrelation zwischen Eigenschaften der verwendeten Inhibitoren und der IC_{50} für die intrazelluläre Tryptasehemmung. **a)** IC_{50} für die Inhibition der intrazellulären Tryptaseaktivität in Abhängigkeit der Affinität (K_i) der reversiblen Inhibitoren. **b)** Inhibition der intrazellulären Tryptaseaktivität (IC_{50}) in Abhängigkeit der molekularen Masse der Inhibitoren.

Zur Analyse der Eigenschaften von Tryptaseinhibitoren auf die Effektivität der Hemmung im Zellkulturmodell wurde die zur halbmaximalen Hemmung benötigten Inhibitorkonzentrationen (IC_{50}) zum einen mit der Dissoziations-

konstanten (K_i) der reversiblen Inhibitoren und zum anderen mit der molekularen Masse der Inhibitoren verglichen (Abb. 5.1). Die Analyse zeigt, dass hochaffine, reversible Inhibitoren (niedrige K_i -Werte) auch im Zellkulturmodell effektiv sind (niedrige IC_{50} -Werte) (Abb. 5.1a). Allerdings ist die im Zellkultur-Experiment benötigte Inhibitorkonzentration um das 20- (TdPI short) bis 20.000-fache (TdPI) höher als die Inhibitorkonzentration, die zur Hemmung der rekombinanten Trypsase β benötigt wird (Tab. 5.1). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Inhibitoren die als Diffusionsbarriere wirkende Zell- und Granulamembran passieren müssen, um Trypsase β intrazellulär hemmen zu können.

Zwischen der molekularen Masse und der Effektivität der Inhibitoren besteht dagegen keine Korrelation (Abb. 5.1b). Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da kleine Substanzen die Diffusionsbarrieren der Zellmembran normalerweise besser überwinden können. Die Affinität des Inhibitors zu Trypsase β spielt neben der Expositionszeit der HMC-1 Zellen mit dem Inhibitor die entscheidende Rolle für die Inhibition der intrazellulären Trypsaseaktivität, nicht aber deren Größe.

Inhibitor	Molekulare Masse [g/mol]	K_i [μ M]	IC_{50} [μ M]	Referenz
PMSF	174	--	1250	[172]
Pefabloc SC	240	--	0,68	[155]
TLCK	369	--	222	[173]
Benzamidin	157	13	>> 1 mM	[174, 175]
rLDTI	4.738	0,0015	10,59	[137]
TdPI short	6.329	1,3	31	[140]
Aprotinin	6.512	>> 100	>> 1	[37]
TdPI	11.159	$0,2 \times 10^{-4}$	0,41	[140]
TdPI short Fusionsprotein	23.593	≈ 1	>> 1	AG Sommerhoff
TdPI Fusionsprotein	28.422	$4,7 \times 10^{-4}$	2,74	AG Sommerhoff

Tab. 5.1: Zur Hemmung der intrazellulären Trypsaseaktivität in HMC-1 Zellen verwendete Inhibitoren mit Angabe der molekularen Masse und der Dissoziationskonstante (K_i) für β -Trypsase, sowie der in Zellkultur experimentell ermittelten halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}). >>: keine Hemmung bei. \approx : etwa.

5.2.2 Toxizität der Inhibitoren

Die HMC-1 Zellen wurden am Ende der Inkubationszeit mittels Trypan Blau bzw. dem 'LDH Cytotoxicity Kit II' untersucht, um die Vitalität der Zellen während der Inkubation mit den Inhibitoren zu überprüfen. Toxische Effekte wurden mit PMSF und Benzamidin beobachtet. Mit 10 mM PMSF sind >95 % der Zellen bereits direkt nach der Zugabe nicht mehr vital, bei Benzamidin wird bei einer Konzentration von 1 bzw. 5 mM nach 24 h eine Toxizität von 5 – 8 % bzw. 30 ± 15 % nachgewiesen. Benzamidin-Konzentrationen >1 mM wurden in den weiteren Inkubationsversuchen demzufolge nicht mehr verwendet. Alle anderen Inhibitoren waren bei den verwandten Konzentrationen nicht toxisch, sodass davon auszugehen ist, dass die verminderte Tryptaseaktivität nicht durch Toxizität bedingt ist.

5.2.3 Einfluss von Benzamidin

Die Inkubation von HMC-1 Zellen mit Benzamidin über 6 h führt nicht zu einer Reduktion der intrazellulären Tryptase β -Aktivität, sondern überraschenderweise zu einer höheren Aktivität. Um diesen Effekt weiter zu analysieren wurde die Inkubationszeit auf 24 h verlängert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Tryptaseaktivität abhängig von Zeit und Konzentration ansteigt; nach 24 h beträgt die Aktivität mit 0,5 – 1 mM Benzamidin 300 ± 20 % der Kontrolle ($n=5$). Eine geringere Proliferationsrate und toxische Effekte (geringere Proliferationsrate, geringe Vitalität) treten bei Benzamidin-Konzentrationen ≤ 1 mM nicht auf.

Die Analyse der Zelllysate mittels Western Blot zeigt eine deutlich höhere immunologisch nachweisbare Tryptasemenge in den Zellen, die mit Benzamidin inkubiert worden waren. Der höheren Tryptaseaktivität liegt eine höhere Enzymmenge pro Zelle zugrunde und demzufolge keine Stabilisierung oder gesteigerte spezifische Aktivität der Protease während der Extraktion.

Basierend auf theoretischen Überlegungen ist nicht zu erwarten, dass die Inhibition der intrazellulären Tryptase β durch Benzamidin mit der verwendeten Methodik in Zelllysaten *ex vivo* nachzuweisen ist. Benzamidin hemmt Serinproteasen wie Tryptase mit hoher Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}), d. h. das Gleichgewicht des Inhibitor-Enzym Komplexes ändert sich bei Konzentrationsänderungen schnell. Eine Hemmung der Tryptaseaktivität *ex vivo* ist nicht nachweisbar, da die Benzamidin-Konzentration während

der Lysatherstellung reduziert wird und der Inhibitor-Enzym Komplex dissoziiert. Gleichzeitig ist so die im Vergleich zu den Kontrollen gesteigerte Tryptaseaktivität bzw. -menge nachweisbar. Hierfür ist möglicherweise eine gesteigerte Expression von Tryptase verantwortlich. Diese kann durch eine höhere Differenzierung der Zellen oder z. B. durch Regulation des Transkriptions- bzw. Translationsprozesses von Tryptase erhöht sein. Die fehlenden Unterschiede zwischen Proben und Kontrollen hinsichtlich Proliferationsrate und Morphologie der Zellen widersprechen einer höheren Differenzierung der Zellen. Bedingt durch die in dieser Arbeit beobachtete Diskrepanz bei der Quantifizierung der Tryptasemenge über Western Blot bzw. Aktivität ist nicht auszuschließen, dass durch Benzamidin vermehrt Tryptase-Zymogen aktiviert wird. Bislang wurde lediglich gezeigt, dass bei der Degranulation der Mastzelle keine weitere Tryptase aktiviert wird, sondern die ausgeschüttete Tryptasemenge der Menge an aktiv gespeicherter Tryptase entspricht [167]. Die Menge an gespeichertem Zymogen in HMC-1 ist unbekannt. Zuletzt kommt als weitere Ursache für die erhöhte Tryptasemenge ein verminderter spontaner Release von Tryptase in das Kultivierungsmedium in Frage [170].

Ein relativer Anstieg der Tryptaseaktivität am Ende des Inkubationszeitraumes, jedoch nie weit über die Kontrolle hinaus, ist auch bei Pefabloc SC und TLCK sowie rLDTI, TdPI und TdPI Fusionsprotein zu beobachten. Ob diesem Anstieg ebenfalls eine erhöhte Tryptasemenge in der Zelle zugrunde liegt, oder die Inhibitoren durch Instabilität (wie z. B. bei Pefabloc SC oder PMSF bekannt) oder Verstoffwechselung ihre Wirkung verlieren bzw. in ihrer Menge nicht für die neu synthetisierte Tryptase ausreichend vorliegen, sollte weitergehend untersucht werden.

5.2.4 Verwendung des Modellsystems zur Charakterisierung von Cathepsin C-Inhibitoren

Cathepsin C ist ein interessantes pharmakologisches Target, da die Cysteinprotease an der Aktivierung von Granula-assoziierten Proteasen, wie Tryptase β , beteiligt ist. Um zu überprüfen, in wieweit das HMC-1-Modellsystem zur Charakterisierung von Cathepsin C-Inhibitoren verwendet werden kann, wurde der Effekt von Cathepsin C-Inhibitoren auf die Aktivität von Cathepsin C und Tryptase in HMC-1 Zelllysaten untersucht.

Das fluorogene Substrat H-GR-AMC ist ein gebräuchliches Substrat zur Quantifizierung von Cathepsin C [176, 177]. Die Cathepsin C-Aktivität im Zelllysate ist mit diesem Substrat gut reproduzierbar nachzuweisen. Allerdings ist H-GR-AMC nicht spezifisch für Cathepsin C, sondern hat lediglich eine höhere Spezifität für Cathepsin C gegenüber anderen Cathepsinen [177-179], sodass in Folgeversuchen untersucht werden sollte, ob neben Cathepsin C auch andere Proteasen im Zelllysate bestimmt werden.

Der unspezifische Cysteinproteaseinhibitor E64 [180] hemmt die Cathepsin C-Aktivität bei Konzentrationen $>10\ \mu\text{M}$ vollständig bis zum Ende der Inkubationszeit. Die vollständige Hemmung ist jedoch erst nach 24 h erreicht. Im Gegensatz dazu hemmt der selektivere Inhibitor HR-57 [125] bereits nach 5 min mit Konzentrationen $\geq 10\ \mu\text{M}$ die Cathepsin C-Aktivität vollständig, diese kann aber nicht während des gesamten Inkubationszeitraumes aufrechterhalten werden, was für eine Inaktivierung des Inhibitors spricht. Die Verwendung des hier entwickelten Zellmodells zur Messung und Inhibition weiterer Granula-assoziiierter Proteasen, wie z. B. Cathepsin C, ist also möglich. Die Tryptaseaktivität ist bei $100\ \mu\text{M}$ E64 nach 24 und 48 h um 50 % gehemmt, bei $50\ \mu\text{M}$ HR-57 beobachtet man zwischen 24 und 30 h lediglich einen Trend zu einer geringeren Aktivität, der nach 48 h nicht mehr sichtbar ist. Um eine Hemmung der Tryptaseaktivität mit Cathepsin C-Inhibitoren zu erzielen ist zunächst, wie es auch für andere Granula-assoziierte Serinproteasen gezeigt wurde [181], eine vollständige Inhibition der Cathepsin C-Aktivität notwendig. Außerdem kann durch die Inhibition der Cathepsin C-Aktivität lediglich die Aktivierung neu synthetisierter Tryptase gehemmt werden, sodass zur vollständigen Inhibition von Tryptase ein längerer Inkubationszeitraum als 48 h mit vollständiger Cathepsin C-Hemmung notwendig ist. Bei zukünftigen Zellkulturstudien über längere Inkubationszeiten kann daher, wie z. B. bei Le *et al* [41], dem Kultivierungsmedium an verschiedenen Zeitpunkten frischer Inhibitor hinzugefügt werden. Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren für die Cathepsine B und L könnte außerdem mit Hilfe dieses Zellmodells eine endgültige Klärung stattfinden, welche Proteasen Tryptase β *in vivo* aktivieren [41, 43, 118].

5.2.5 Hypothese zur Lokalisation des Inhibitor-Tryptase Kontaktes

Zusammenfassend zeigen die zuvor genannten Untersuchungen, dass eine Hemmung der intrazellulären Tryptase β in HMC-1 stattfindet. Diese Hemmung korreliert mit der Affinität der Inhibitoren zu Tryptase β sowie mit der Expositionszeit der Zellen mit dem Inhibitor, nicht dagegen mit deren molekularer Masse. Es ist anzunehmen, dass eine Internalisierung der Inhibitoren stattfindet und die Tryptaseaktivität noch in den intakten Zellen intrazellulär gehemmt wird. Für diese Hypothese spricht, dass die IC_{50} im Zellkulturversuch wesentlich höher ist als die zur Inhibition des rekombinanten Enzyms notwendige Konzentration (K_i). Ähnliche Unterschiede wurden bereits für die Effekte von Cathepsin C-Inhibitoren in U937- und EcoM-G Zellen gezeigt [182]. Außerdem nimmt die Tryptaseaktivität während des Inkubationszeitraums, z. B. mit Pefabloc SC, bis zur maximalen Inhibition relativ langsam ab. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Diffusionsbarriere zwischen Inhibitor und Enzym, wie z. B. die Zell- und Granulamembranen, besteht. Bei einem Kontakt von Inhibitor und Protease nach der Zellyse wäre dagegen eine deutlich höhere Hemmung bereits zum Startzeitpunkt ($t=0$) zu erwarten. Letztendlich konnte der His₆-Tag des TdPI Fusionsproteins mittels Western Blot in den Zellysaten nachgewiesen werden (s. 4.3.4), sodass zumindest für das TdPI Fusionsprotein eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen ist.

Obwohl die Tryptaseaktivität *ex vivo* in Zellysaten gemessen wird, sind Artefakte durch eine Hemmung von Tryptase β während oder nach der Lyse weitgehend ausgeschlossen. Das mit dem Inhibitor versetzte Kultivierungsmedium wurde durch mehrere Waschschriffe von den intakten Zellen entfernt. Inhibitions-Artefakte durch spätere Lösungsmittel bzw. die weiteren Verarbeitungsschritte können durch die mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden. Durch die in dieser Arbeit verwendete Methode ist nicht sicher auszuschließen, dass das initiale Aufeinandertreffen von Tryptase und Inhibitor nicht intra- sondern extrazellulär stattfindet. So könnten die HMC-1 Zellen bei der Verarbeitung durch den mechanischen Reiz degranulieren, der Inhibitor im Extrazellulärraum an Tryptase β binden und als Inhibitor-Enzym Komplex wieder in die Zelle aufgenommen werden. Als verschiedene Wiederaufnahme-Mechanismen wären z. B. eine Clathrin-abhängige Endozytose [183], Sortilin [184] oder Mannose-6-Phosphat Rezeptoren [185, 186] denkbar. Die Aufklärung der

genauen Lokalisation des Erstkontaktes kann mittels anderer, z. B. mit Tags oder radioaktiven Markierungen versetzter, Inhibitoren an intakten Zellen stattfinden. Von weiterem Interesse ist außerdem der Mechanismus der Internalisierung von Inhibitoren. Je nach Größe und Art des Inhibitors könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein, für kleine Moleküle wie z. B. PMSF eine direkte Diffusion, bei größeren, proteinergeren Inhibitoren ist dagegen eine Internalisierung z. B. über Transportkanäle oder Endozytose wahrscheinlicher [187-190].

5.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit mit Modellsubstanzen erhobenen Daten belegen, dass das etablierte Zellkulturmodell zu Charakterisierung von Tryptase- und Cathepsin C-Inhibitoren geeignet ist. Durch die Überführung des Zellkulturmodells auf das 96-Well-Mikrotiterplattenformat können die Effekte verschiedener Inhibitoren auf die Tryptase- sowie Cathepsin C-Aktivität mit relativ geringem Zeitaufwand miteinander verglichen werden. Demzufolge ist die Methode grundsätzlich dazu geeignet, Substanzbibliotheken zu screenen. Hierfür wäre ggf. eine weitere Miniaturisierung auf 384-Well Mikrotiterplatten wünschenswert. Zur weiteren Annäherung an den physiologischen Zustand könnte z. B. auf Einzell-Ebene mittels FACS-Analyse und Zell-permeablen Substraten ein Modell entwickelt werden, um die Hemmung in der Einzelzelle zu beobachten [191]. Neben HMC-1 Zellen könnten andere, höher differenzierte Mastzelllinien, wie z. B. der LUVA-Zelllinie [156], und isolierte reife Mastzellen verwendet werden, um die Ergebnisse zu bestätigen.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Inhibitoren in Granula gelangen und die dort aktiv gespeicherte Tryptase hemmen können. Für die weitere Entwicklung von Tryptaseinhibitoren für den klinischen Alltag ist dies von großer Bedeutung. Um die intrazellulär gespeicherte Tryptase aller Mastzellen eines Menschen bzw. Versuchstieres *in vivo* vollständig zu hemmen, muss eine hohe Menge des Inhibitors verabreicht werden. Außerdem haben die Ergebnisse gezeigt, dass die kinetischen Eigenschaften eines Inhibitors eine große Rolle spielen, da die Konzentrationsverhältnisse im Extrazellulärraum nach der Degranulation der Mastzelle deutlich von denen intrazellulär abweichen und der Inhibitor-Enzym-Komplex bei reversiblen Inhibitoren sehr schnell zerfallen kann.

Daneben bleibt aktuell völlig unklar, wie sich eine intrazelluläre Tryptaseinhibition auf die intrazellulären Funktionen von Tryptase [105] in Mastzellen auswirken kann. Diese neuen Fragen, die sich aus dieser Arbeit ergeben, wurden in den bislang publizierten klinischen Studien nicht adressiert [97, 153].

Überraschend ist außerdem die gesteigerte Tryptasemenge in der Zelle nach der Inkubation mit Benamidin. Ob dies ein genereller Mechanismus bei der Hemmung von Tryptase β oder spezifisch für Benamidin ist, muss durch weiterführende Experimente (z. B. mittels Western Blot oder ELISA) und mit anderen Inhibitoren geklärt werden. Ein solcher Feedback-Mechanismus muss, ebenso wie die mögliche Internalisierung von Inhibitoren, in Zukunft bei der Entwicklung neuer Inhibitoren berücksichtigt und *in vivo* untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Dvorak, A.M. (2005) *Ultrastructural studies of human basophils and mast cells*. J Histochem Cytochem, 53(9): p. 1043-70.
2. Sommerhoff, C.P., W. Bode, P.J. Pereira, M.T. Stubbs, J. Sturzebecher, G.P. Piechottka, G. Matschiner, and A. Bergner (1999) *The structure of the human betall-tryptase tetramer: fo(u)r better or worse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(20): p. 10984-91.
3. Himmelweit, F. (1956) *Paul Ehrlichs Gesammelte Arbeiten. Bd. 1. Englische Übersetzung*. Springer: Berlin, Göttingen, Heidelberg.
4. Beaven, M.A. (2009) *Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now*. Eur J Immunol, 39(1): p. 11-25.
5. Yong, L.C. (1997) *The mast cell: origin, morphology, distribution, and function*. Exp Toxicol Pathol, 49(6): p. 409-24.
6. Dahlin, J.S. and J. Hallgren (2015) *Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues*. Mol Immunol, 63(1): p. 9-17.
7. Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka (1978) *Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation*. Blood, 52(2): p. 447-52.
8. Grimaldeston, M.A., C.C. Chen, A.M. Piliponsky, M. Tsai, S.Y. Tam, and S.J. Galli (2005) *Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo*. Am J Pathol, 167(3): p. 835-48.
9. Wernersson, S. and G. Pejler (2014) *Mast cell secretory granules: armed for battle*. Nat Rev Immunol, 14(7): p. 478-94.
10. Schneider, L.A., S.M. Schlenner, T.B. Feyerabend, M. Wunderlin, and H.R. Rodewald (2007) *Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin*. J Exp Med, 204(11): p. 2629-39.
11. Metz, M., A.M. Piliponsky, C.C. Chen, V. Lamm, M. Abrink, G. Pejler, M. Tsai, and S.J. Galli (2006) *Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms*. Science, 313(5786): p. 526-30.
12. Molderings, G.J. (2010) *Mast cell function in physiology and pathophysiology*. Biotrend Reviews, 1-2010.
13. Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S.N. Abraham (1996) *Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha*. Nature, 381(6577): p. 77-80.
14. He, S. and A.F. Walls (1997) *Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation*. Eur J Pharmacol, 328(1): p. 89-97.
15. Steinhoff, M., N. Vergnolle, S.H. Young, M. Tognetto, S. Amadesi, H.S. Ennes, M. Trevisani, M.D. Hollenberg, J.L. Wallace, G.H. Caughey, S.E. Mitchell, L.M. Williams, P. Geppetti, E.A. Mayer, and N.W. Bunnett (2000) *Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism*. Nat Med, 6(2): p. 151-8.
16. Xu, X., D. Zhang, N. Lyubynska, P.J. Wolters, N.P. Killeen, P. Baluk, D.M. McDonald, S. Hawgood, and G.H. Caughey (2006) *Mast cells protect mice from Mycoplasma pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 173(2): p. 219-25.
17. Lu, L.F., E.F. Lind, D.C. Gondek, K.A. Bennett, M.W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z.A. Scott, A.J. Coyle, J.L. Reed, J. Van Snick, T.B. Strom, X.X. Zheng, and R.J. Noelle (2006) *Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance*. Nature, 442(7106): p. 997-1002.
18. Chan, C.Y., A.L. St John, and S.N. Abraham (2013) *Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection*. Immunity, 38(2): p. 349-59.

19. Douaiher, J., J. Succar, L. Lancerotto, M.F. Gurish, D.P. Orgill, M.J. Hamilton, S.A. Krilis, and R.L. Stevens (2014) *Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing*. Adv Immunol, 122: p. 211-52.
20. Wulff, B.C. and T.A. Wilgus (2013) *Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye?* Exp Dermatol, 22(8): p. 507-10.
21. St John, A.L., C.Y. Chan, H.F. Staats, K.W. Leong, and S.N. Abraham (2012) *Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes*. Nat Mater, 11(3): p. 250-7.
22. Anand, P., B. Singh, A.S. Jaggi, and N. Singh (2012) *Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 385(7): p. 657-70.
23. Horny, H.P., K. Sotlar, and P. Valent (2007) *Mastocytosis: state of the art*. Pathobiology, 74(2): p. 121-32.
24. Valent, P., C. Akin, M. Arock, K. Brockow, J.H. Butterfield, M.C. Carter, M. Castells, L. Escribano, K. Hartmann, P. Lieberman, B. Nedoszytko, A. Orfao, L.B. Schwartz, K. Sotlar, W.R. Sperr, M. Triggiani, R. Valenta, H.P. Horny, and D.D. Metcalfe (2012) *Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal*. Int Arch Allergy Immunol, 157(3): p. 215-25.
25. Wagner, N. and P. Staubach (2018) *Mastozytose - Pathogenese, Klinik und Therapie*. J Dtsch Dermatol Ges, 16(1): p. 42-59.
26. Butterfield, J.H., D. Weiler, G. Dewald, and G.J. Gleich (1988) *Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia*. Leuk Res, 12(4): p. 345-55.
27. Nilsson, G., T. Blom, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellen, J.H. Butterfield, C. Sundstrom, K. Nilsson, and L. Hellman (1994) *Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1*. Scand J Immunol, 39(5): p. 489-98.
28. Guhl, S., M. Babina, A. Neou, T. Zuberbier, and M. Artuc (2010) *Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines*. Exp Dermatol, 19(9): p. 845-7.
29. Haenisch, B., S. Herms, and G.J. Molderings (2013) *The transcriptome of the human mast cell leukemia cells HMC-1.2: an approach to identify specific changes in the gene expression profile in KitD816V systemic mastocytosis*. Immunol Res, 56(1): p. 155-62.
30. Akin, C., K. Brockow, C. D'Ambrosio, A.S. Kirshenbaum, Y. Ma, B.J. Longley, and D.D. Metcalfe (2003) *Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit*. Exp Hematol, 31(8): p. 686-92.
31. Weber, S., M. Babina, S. Kruger-Krasagakes, A. Grutzkau, and B.M. Henz (1996) *A subclone (5C6) of the human mast cell line HMC-1 represents a more differentiated phenotype than the original cell line*. Arch Dermatol Res, 288(12): p. 778-82.
32. Glenner, G.G. and L.A. Cohen (1960) *Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells*. Nature, 185: p. 846-7.
33. Trivedi, N.N., Q. Tong, K. Raman, V.J. Bhagwandin, and G.H. Caughey (2007) *Mast cell alpha and beta tryptases changed rapidly during primate speciation and evolved from gamma-like transmembrane peptidases in ancestral vertebrates*. J Immunol, 179(9): p. 6072-9.
34. Huang, C., G. Morales, A. Vagi, K. Chanasyk, M. Ferrazzi, C. Burklow, W.T. Qiu, E. Feyfant, A. Sali, and R.L. Stevens (2000) *Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases. Dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface*. J Biol Chem, 275(1): p. 351-8.
35. Trivedi, N.N., B. Tamraz, C. Chu, P.Y. Kwok, and G.H. Caughey (2009) *Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent*

- inheritance of loss-of-function mutations*. J Allergy Clin Immunol, 124(5): p. 1099-105 e1-4.
36. Vanderslice, P., S.M. Ballinger, E.K. Tam, S.M. Goldstein, C.S. Craik, and G.H. Caughey (1990) *Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(10): p. 3811-5.
37. Sommerhoff, C.P., W. Bode, G. Matschiner, A. Bergner, and H. Fritz (2000) *The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure*. Biochim Biophys Acta, 1477(1-2): p. 75-89.
38. Wang, Y., Q.C. Zheng, C.P. Kong, Y. Tian, J. Zhan, J.L. Zhang, and H.X. Zhang (2015) *Heparin makes differences: a molecular dynamics simulation study on the human betall-tryptase monomer*. Mol Biosyst, 11(1): p. 252-61.
39. Sakai, K., S. Ren, and L.B. Schwartz (1996) *A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I*. J Clin Invest, 97(4): p. 988-95.
40. Le, Q.T., H.K. Min, H.Z. Xia, Y. Fukuoka, N. Katunuma, and L.B. Schwartz (2011) *Promiscuous processing of human alphabeta-protryptases by cathepsins L, B, and C*. J Immunol, 186(12): p. 7136-43.
41. Le, Q.T., G. Gomez, W. Zhao, J. Hu, H.Z. Xia, Y. Fukuoka, N. Katunuma, and L.B. Schwartz (2011) *Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B, and C*. J Immunol, 187(4): p. 1912-8.
42. Sommerhoff, C.P. and N. Schaschke (2007) *Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story*. Curr Pharm Des, 13(3): p. 313-32.
43. Sheth, P.D., J. Pedersen, A.F. Walls, and A.R. McEuen (2003) *Inhibition of dipeptidyl peptidase I in the human mast cell line HMC-1: blocked activation of tryptase, but not of the predominant chymotryptic activity*. Biochem Pharmacol, 66(11): p. 2251-62.
44. Selwood, T., H. Smolensky, D.R. McCaslin, and N.M. Schechter (2005) *The interaction of human tryptase-beta with small molecule inhibitors provides new insights into the unusual functional instability and quaternary structure of the protease*. Biochemistry, 44(9): p. 3580-90.
45. Harris, J.L., A. Niles, K. Burdick, M. Maffitt, B.J. Backes, J.A. Ellman, I. Kuntz, M. Haak-Frendscho, and C.S. Craik (2001) *Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases I and II*. J Biol Chem, 276(37): p. 34941-7.
46. Greenfeder, S., S. Sehring, N. McHugh, M. Corboz, M. Rivelli, J.C. Anthes, M. Billah, R.W. Egan, and R.W. Chapman (2001) *Tryptase-induced airway microvascular leakage in guinea pigs: involvement of tachykinins and leukotrienes*. Eur J Pharmacol, 419(2-3): p. 261-7.
47. Maier, M., J. Spragg, and L.B. Schwartz (1983) *Inactivation of human high molecular weight kininogen by human mast cell tryptase*. J Immunol, 130(5): p. 2352-6.
48. Proud, D., E.S. Siekierski, and G.S. Bailey (1988) *Identification of human lung mast cell kininogenase as tryptase and relevance of tryptase kininogenase activity*. Biochem Pharmacol, 37(8): p. 1473-80.
49. Sekizawa, K., G.H. Caughey, S.C. Lazarus, W.M. Gold, and J.A. Nadel (1989) *Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs*. J Clin Invest, 83(1): p. 175-9.
50. Ruoss, S.J., T. Hartmann, and G.H. Caughey (1991) *Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts*. J Clin Invest, 88(2): p. 493-9.
51. Gruber, B.L., R.R. Kew, A. Jelaska, M.J. Marchese, J. Garlick, S. Ren, L.B. Schwartz, and J.H. Korn (1997) *Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis*. J Immunol, 158(5): p. 2310-7.
52. Berger, P., D.W. Perng, H. Thabrew, S.J. Compton, J.A. Cairns, A.R. McEuen, R. Marthan, J.M. Tunon De Lara, and A.F. Walls (2001) *Tryptase and agonists*

- of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* (1985), 91(3): p. 1372-9.
53. Brown, J.K., C.A. Jones, L.A. Rooney, G.H. Caughey, and I.P. Hall (2002) *Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via nonproteolytic actions*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(2): p. L197-206.
54. He, S., M.D. Gaca, and A.F. Walls (1998) *A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase*. *J Pharmacol Exp Ther*, 286(1): p. 289-97.
55. He, S.H., H. Xie, and Y.L. Fu (2005) *Activation of human tonsil and skin mast cells by agonists of proteinase activated receptor-2*. *Acta Pharmacol Sin*, 26(5): p. 568-74.
56. Garbuzenko, E., A. Nagler, D. Pickholtz, P. Gillery, R. Reich, F.X. Maquart, and F. Levi-Schaffer (2002) *Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis*. *Clin Exp Allergy*, 32(2): p. 237-46.
57. Cairns, J.A. and A.F. Walls (1997) *Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts*. *J Clin Invest*, 99(6): p. 1313-21.
58. He, S., Q. Peng, and A.F. Walls (1997) *Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine*. *J Immunol*, 159(12): p. 6216-25.
59. Cairns, J.A. and A.F. Walls (1996) *Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression*. *J Immunol*, 156(1): p. 275-83.
60. Huang, C., D.S. Friend, W.T. Qiu, G.W. Wong, G. Morales, J. Hunt, and R.L. Stevens (1998) *Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6*. *J Immunol*, 160(4): p. 1910-9.
61. Cottrell, G.S., S. Amadesi, F. Schmidlin, and N. Bunnett (2003) *Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function*. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6): p. 1191-7.
62. Lindner, J.R., M.L. Kahn, S.R. Coughlin, G.R. Sambrano, E. Schauble, D. Bernstein, D. Foy, A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley (2000) *Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice*. *J Immunol*, 165(11): p. 6504-10.
63. Schmidlin, F., S. Amadesi, K. Dabbagh, D.E. Lewis, P. Knott, N.W. Bunnett, P.R. Gater, P. Geppetti, C. Bertrand, and M.E. Stevens (2002) *Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway*. *J Immunol*, 169(9): p. 5315-21.
64. Knight, D.A., S. Lim, A.K. Scaffidi, N. Roche, K.F. Chung, G.A. Stewart, and P.J. Thompson (2001) *Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 108(5): p. 797-803.
65. Ferrell, W.R., J.C. Lockhart, E.B. Kelso, L. Dunning, R. Plevin, S.E. Meek, A.J. Smith, G.D. Hunter, J.S. McLean, F. McGarry, R. Ramage, L. Jiang, T. Kanke, and J. Kawagoe (2003) *Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis*. *J Clin Invest*, 111(1): p. 35-41.
66. Palmer, H.S., E.B. Kelso, J.C. Lockhart, C.P. Sommerhoff, R. Plevin, F.G. Goh, and W.R. Ferrell (2007) *Protease-activated receptor 2 mediates the proinflammatory effects of synovial mast cells*. *Arthritis Rheum*, 56(11): p. 3532-40.
67. Fajardo, I. and G. Pejler (2003) *Formation of active monomers from tetrameric human beta-tryptase*. *Biochem J*, 369(Pt 3): p. 603-10.
68. Fukuoka, Y. and L.B. Schwartz (2004) *Human beta-tryptase: detection and characterization of the active monomer and prevention of tetramer reconstitution by protease inhibitors*. *Biochemistry*, 43(33): p. 10757-64.

69. Strik, M.C., A. Wolbink, D. Wouters, B.A. Bladergroen, A.R. Verlaan, I.S. van Houdt, S. Hijlkema, C.E. Hack, and J.A. Kummer (2004) *Intracellular serpin SERPINB6 (PI6) is abundantly expressed by human mast cells and forms complexes with beta-tryptase monomers*. Blood, 103(7): p. 2710-7.
70. Gruber, B.L., M.J. Marchese, K. Suzuki, L.B. Schwartz, Y. Okada, H. Nagase, and N.S. Ramamurthy (1989) *Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation*. J Clin Invest, 84(5): p. 1657-62.
71. Lees, M., D.J. Taylor, and D.E. Woolley (1994) *Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B*. Eur J Biochem, 223(1): p. 171-7.
72. Imamura, T., A. Dubin, W. Moore, R. Tanaka, and J. Travis (1996) *Induction of vascular permeability enhancement by human tryptase: dependence on activation of prekallikrein and direct release of bradykinin from kininogens*. Lab Invest, 74(5): p. 861-70.
73. Kielty, C.M., M. Lees, C.A. Shuttleworth, and D. Woolley (1993) *Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases*. Biochem Biophys Res Commun, 191(3): p. 1230-6.
74. Ren, S., A.E. Lawson, M. Carr, C.M. Baumgarten, and L.B. Schwartz (1997) *Human tryptase fibrinogenolysis is optimal at acidic pH and generates anticoagulant fragments in the presence of the anti-tryptase monoclonal antibody B12*. J Immunol, 159(7): p. 3540-8.
75. Huang, C., G.W. Wong, N. Ghildyal, M.F. Gurish, A. Sali, R. Matsumoto, W.T. Qiu, and R.L. Stevens (1997) *The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma*. J Biol Chem, 272(50): p. 31885-93.
76. Thomas, V.A., C.J. Wheelless, M.S. Stack, and D.A. Johnson (1998) *Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption*. Biochemistry, 37(8): p. 2291-8.
77. Guyot, N., M.L. Zani, P. Berger, S. Dallet-Choisy, and T. Moreau (2005) *Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin*. Biol Chem, 386(4): p. 391-9.
78. Fajardo, I. and G. Pejler (2003) *Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase*. J Immunol, 171(3): p. 1493-9.
79. Raymond, W.W., C.P. Sommerhoff, and G.H. Caughey (2005) *Mastin is a gelatinolytic mast cell peptidase resembling a mini-proteasome*. Arch Biochem Biophys, 435(2): p. 311-22.
80. Schechter, N.M., L.F. Brass, R.M. Lavker, and P.J. Jensen (1998) *Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts*. J Cell Physiol, 176(2): p. 365-73.
81. Steinhoff, M., C.U. Corvera, M.S. Thoma, W. Kong, B.E. McAlpine, G.H. Caughey, J.C. Ansel, and N.W. Bunnett (1999) *Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase*. Exp Dermatol, 8(4): p. 282-94.
82. Molino, M., E.S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J.A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis, and L.F. Brass (1997) *Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2*. J Biol Chem, 272(7): p. 4043-9.
83. Caughey, G.H., F. Leidig, N.F. Viro, and J.A. Nadel (1988) *Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase*. J Pharmacol Exp Ther, 244(1): p. 133-7.
84. Pang, L., M. Nie, L. Corbett, A. Sutcliffe, and A.J. Knox (2006) *Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities*. J Immunol, 176(6): p. 3788-95.
85. Tam, E.K. and G.H. Caughey (1990) *Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 3(1): p. 27-32.

86. Sommerhoff, C.P. (2001) *Mast cell tryptases and airway remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 164(10 Pt 2): p. S52-8.
87. Stack, M.S. and D.A. Johnson (1994) *Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase)*. J Biol Chem, 269(13): p. 9416-9.
88. Fukuoka, Y., H.Z. Xia, L.B. Sanchez-Munoz, A.L. Dellinger, L. Escribano, and L.B. Schwartz (2008) *Generation of anaphylatoxins by human beta-tryptase from C3, C4, and C5*. J Immunol, 180(9): p. 6307-16.
89. Schwartz, L.B., M.S. Kawahara, T.E. Hugli, D. Vik, D.T. Fearon, and K.F. Austen (1983) *Generation of C3a anaphylatoxin from human C3 by human mast cell tryptase*. J Immunol, 130(4): p. 1891-5.
90. Lee, M., C.P. Sommerhoff, A. von Eckardstein, F. Zettl, H. Fritz, and P.T. Kovanen (2002) *Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 22(12): p. 2086-91.
91. Spinnler, K., T. Frohlich, G.J. Arnold, L. Kunz, and A. Mayerhofer (2011) *Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action*. J Biol Chem, 286(36): p. 31707-13.
92. Berger, P., S.J. Compton, M. Molimard, A.F. Walls, C. N'Guyen, R. Marthan, and J.M. Tunon-De-Lara (1999) *Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi*. Clin Exp Allergy, 29(6): p. 804-12.
93. Barrios, V.E., S.C. Middleton, M.A. Kashem, A.M. Havill, C.F. Toombs, and C.D. Wright (1998) *Tryptase mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi*. Life Sci, 63(26): p. 2295-303.
94. Molinari, J.F., W.R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, J.H. Butterfield, and W.M. Abraham (1995) *Role of tryptase in immediate cutaneous responses in allergic sheep*. J Appl Physiol (1985), 79(6): p. 1966-70.
95. Molinari, J.F., M. Scuri, W.R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, and W.M. Abraham (1996) *Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release*. Am J Respir Crit Care Med, 154(3 Pt 1): p. 649-53.
96. Lee, H., J.H. Park, D.I. Park, H.J. Kim, Y.K. Cho, C.I. Sohn, W.K. Jeon, B.I. Kim, and S.W. Chae (2013) *Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome*. J Neurogastroenterol Motil, 19(2): p. 244-50.
97. Tremaine, W.J., A. Brzezinski, J.A. Katz, D.C. Wolf, T.J. Fleming, J. Mordenti, L.C. Strenkoski-Nix, M.C. Kurth, and A.U.C.S. Group (2002) *Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study*. Aliment Pharmacol Ther, 16(3): p. 407-13.
98. Cenac, N., A.M. Coelho, C. Nguyen, S. Compton, P. Andrade-Gordon, W.K. MacNaughton, J.L. Wallace, M.D. Hollenberg, N.W. Bunnett, R. Garcia-Villar, L. Bueno, and N. Vergnolle (2002) *Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2*. Am J Pathol, 161(5): p. 1903-15.
99. Namazi, M.R. (2005) *Possible molecular mechanisms to account for the involvement of tryptase in the pathogenesis of psoriasis*. Autoimmunity, 38(6): p. 449-52.
100. Coussens, L.M., W.W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G.H. Cughey, and D. Hanahan (1999) *Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis*. Genes Dev, 13(11): p. 1382-97.
101. Yoshii, M., A. Jikuhara, S. Mori, H. Iwagaki, H.K. Takahashi, M. Nishibori, and N. Tanaka (2005) *Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners*. J Pharmacol Sci, 98(4): p. 450-8.

102. Marech, I., M. Ammendola, R. Sacco, G.S. Capriuolo, R. Patruno, R. Rubini, M. Luposella, V. Zuccala, E. Savino, C.D. Gadaleta, D. Ribatti, and G. Ranieri (2014) *Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance*. BMC Cancer, 14: p. 534.
103. Ribatti, D. and G. Ranieri (2015) *Tryptase, a novel angiogenic factor stored in mast cell granules*. Exp Cell Res, 332(2): p. 157-62.
104. He, A. and G.P. Shi (2013) *Mast cell chymase and tryptase as targets for cardiovascular and metabolic diseases*. Curr Pharm Des, 19(6): p. 1114-25.
105. Melo, F.R., F. Vita, B. Berent-Maoz, F. Levi-Schaffer, G. Zabucchi, and G. Pejler (2014) *Proteolytic histone modification by mast cell tryptase, a serglycin proteoglycan-dependent secretory granule protease*. J Biol Chem, 289(11): p. 7682-90.
106. Payne, V. and P.C. Kam (2004) *Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance*. Anaesthesia, 59(7): p. 695-703.
107. Schwartz, L.B. (2006) *Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis*. Immunol Allergy Clin North Am, 26(3): p. 451-63.
108. Marquardt, U., F. Zettl, R. Huber, W. Bode, and C. Sommerhoff (2002) *The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region*. J Mol Biol, 321(3): p. 491-502.
109. Wang, H.W., H.P. McNeil, A. Husain, K. Liu, N. Tedla, P.S. Thomas, M. Raftery, G.C. King, Z.Y. Cai, and J.E. Hunt (2002) *Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity*. J Immunol, 169(9): p. 5145-52.
110. Trivedi, N.N., W.W. Raymond, and G.H. Caughey (2008) *Chimerism, point mutation, and truncation dramatically transformed mast cell delta-tryptases during primate evolution*. J Allergy Clin Immunol, 121(5): p. 1262-8.
111. Wong, G.W., P.S. Foster, S. Yasuda, J.C. Qi, S. Mahalingam, E.A. Mellor, G. Katsoulotos, L. Li, J.A. Boyce, S.A. Krilis, and R.L. Stevens (2002) *Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway*. J Biol Chem, 277(44): p. 41906-15.
112. Caughey, G.H., W.W. Raymond, J.L. Blount, L.W. Hau, M. Pallaoro, P.J. Wolters, and G.M. Verghese (2000) *Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families*. J Immunol, 164(12): p. 6566-75.
113. Yuan, J., J. Beltman, E. Gjerstad, M.T. Nguyen, J. Sampang, H. Chan, J.W. Janc, and J.M. Clark (2006) *Expression and characterization of recombinant gamma-tryptase*. Protein Expr Purif, 49(1): p. 47-54.
114. Hansbro, P.M., M.J. Hamilton, M. Fricker, S.L. Gellatly, A.G. Jarnicki, D. Zheng, S.M. Frei, G.W. Wong, S. Hamadi, S. Zhou, P.S. Foster, S.A. Krilis, and R.L. Stevens (2014) *Importance of mast cell Prss31/transmembrane tryptase/tryptase-gamma in lung function and experimental chronic obstructive pulmonary disease and colitis*. J Biol Chem, 289(26): p. 18214-27.
115. Turk, D., V. Janjic, I. Stern, M. Podobnik, D. Lamba, S.W. Dahl, C. Lauritzen, J. Pedersen, V. Turk, and B. Turk (2001) *Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases*. EMBO J, 20(23): p. 6570-82.
116. Pham, C.T. and T.J. Ley (1999) *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(15): p. 8627-32.

117. Adkison, A.M., S.Z. Raptis, D.G. Kelley, and C.T. Pham (2002) *Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis*. J Clin Invest, 109(3): p. 363-71.
118. Wolters, P.J., C.T. Pham, D.J. Muilenburg, T.J. Ley, and G.H. Caughey (2001) *Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice*. J Biol Chem, 276(21): p. 18551-6.
119. Qin, Y. and G.P. Shi (2011) *CysteinyI cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases*. Pharmacol Ther, 131(3): p. 338-50.
120. Pagano, M.B., M.A. Bartoli, T.L. Ennis, D. Mao, P.M. Simmons, R.W. Thompson, and C.T. Pham (2007) *Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(8): p. 2855-60.
121. Mallen-St Clair, J., C.T. Pham, S.A. Villalta, G.H. Caughey, and P.J. Wolters (2004) *Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis*. J Clin Invest, 113(4): p. 628-34.
122. Pham, C.T., J.L. Ivanovich, S.Z. Raptis, B. Zehnbaue, and T.J. Ley (2004) *Papillon-Lefevre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans*. J Immunol, 173(12): p. 7277-81.
123. Pahwa, P., A.K. Lamba, F. Faraz, and S. Tandon (2010) *Haim-Munk syndrome*. J Indian Soc Periodontol, 14(3): p. 201-3.
124. Korkmaz, B., M.S. Horwitz, D.E. Jenne, and F. Gauthier (2010) *Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases*. Pharmacol Rev, 62(4): p. 726-59.
125. Radzey, H., M. Rethmeier, D. Klimpel, M. Grundhuber, C.P. Sommerhoff, and N. Schaschke (2013) *E-64c-hydrazide: a lead structure for the development of irreversible cathepsin C inhibitors*. ChemMedChem, 8(8): p. 1314-21.
126. Mellon, M.B., B.T. Frank, and K.C. Fang (2002) *Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes*. J Immunol, 168(1): p. 290-7.
127. Tchougounova, E., A. Lundequist, I. Fajardo, J.O. Winberg, M. Abrink, and G. Pejler (2005) *A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and pro-matrix metalloproteinase-2*. J Biol Chem, 280(10): p. 9291-6.
128. Frank, B.T., J.C. Rossall, G.H. Caughey, and K.C. Fang (2001) *Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase*. J Immunol, 166(4): p. 2783-92.
129. Li, M., K. Liu, J. Michalick, J.A. Angus, J.E. Hunt, L.J. Dell'Italia, M.P. Feneley, R.M. Graham, and A. Husain (2004) *Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation*. J Clin Invest, 114(1): p. 112-20.
130. Johnson, J.L., C.L. Jackson, G.D. Angelini, and S.J. George (1998) *Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18(11): p. 1707-15.
131. Nagata, N., Y. Niwa, and Y. Nakaya (2000) *A novel 31-amino-acid-length endothelin, ET-1(1-31), can act as a biologically active peptide for vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 275(2): p. 595-600.
132. Goldstein, S.M., J. Leong, L.B. Schwartz, and D. Cooke (1992) *Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase*. J Immunol, 148(8): p. 2475-82.
133. Piliponsky, A.M., C.C. Chen, T. Nishimura, M. Metz, E.J. Rios, P.R. Dobner, E. Wada, K. Wada, S. Zacharias, U.M. Mohanasundaram, J.D. Faix, M. Abrink, G. Pejler, R.G. Pearl, M. Tsai, and S.J. Galli (2008) *Neurotensin increases mortality*

- and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med*, 14(4): p. 392-8.
134. Maurer, M., J. Wedemeyer, M. Metz, A.M. Piliponsky, K. Weller, D. Chatterjea, D.E. Clouthier, M.M. Yanagisawa, M. Tsai, and S.J. Galli (2004) *Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity*. *Nature*, 432(7016): p. 512-6.
135. Woodruff, P.G., H.A. Boushey, G.M. Dolganov, C.S. Barker, Y.H. Yang, S. Donnelly, A. Ellwanger, S.S. Sidhu, T.P. Dao-Pick, C. Pantoja, D.J. Erle, K.R. Yamamoto, and J.V. Fahy (2007) *Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(40): p. 15858-63.
136. Sommerhoff, C.P., C. Sollner, R. Mentele, G.P. Piechottka, E.A. Auerswald, and H. Fritz (1994) *A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375(10): p. 685-94.
137. Stubbs, M.T., R. Morenweiser, J. Sturzebecher, M. Bauer, W. Bode, R. Huber, G.P. Piechottka, G. Matschiner, C.P. Sommerhoff, H. Fritz, and E.A. Auerswald (1997) *The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. Implications for the structure of human mast cell tryptase and its inhibition*. *J Biol Chem*, 272(32): p. 19931-7.
138. Pohlig, G., G. Fendrich, R. Knecht, B. Eder, G. Piechottka, C.P. Sommerhoff, and J. Heim (1996) *Purification, characterization and biological evaluation of recombinant leech-derived tryptase inhibitor (rLDTI) expressed at high level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Eur J Biochem*, 241(2): p. 619-26.
139. Pantoja-Uceda, D., J.L. Arolas, F.X. Aviles, J. Santoro, S. Ventura, and C.P. Sommerhoff (2009) *Deciphering the structural basis that guides the oxidative folding of leech-derived tryptase inhibitor*. *J Biol Chem*, 284(51): p. 35612-20.
140. Bronsoms, S., D. Pantoja-Uceda, D. Gabrijelcic-Geiger, L. Sanglas, F.X. Aviles, J. Santoro, C.P. Sommerhoff, and J.L. Arolas (2011) *Oxidative folding and structural analyses of a Kunitz-related inhibitor and its disulfide intermediates: functional implications*. *J Mol Biol*, 414(3): p. 427-41.
141. Paesen, G.C., C. Siebold, K. Harlos, M.F. Peacey, P.A. Nuttall, and D.I. Stuart (2007) *A tick protein with a modified Kunitz fold inhibits human tryptase*. *J Mol Biol*, 368(4): p. 1172-86.
142. Lundequist, A., M.A. Juliano, L. Juliano, and G. Pejler (2003) *Polycationic peptides as inhibitors of mast cell serine proteases*. *Biochem Pharmacol*, 65(7): p. 1171-80.
143. Elrod, K.C., W.R. Moore, W.M. Abraham, and R.D. Tanaka (1997) *Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, abolishes late-phase airway responses in allergic sheep*. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(2 Pt 1): p. 375-81.
144. Liu, D., X. Gan, P. Huang, X. Chen, M. Ge, and Z. Hei (2012) *Inhibiting tryptase after ischemia limits small intestinal ischemia-reperfusion injury through protease-activated receptor 2 in rats*. *J Trauma Acute Care Surg*, 73(5): p. 1138-44.
145. Hallgren, J. and G. Pejler (2006) *Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator*. *FEBS J*, 273(9): p. 1871-95.
146. Clark, J.M., W.M. Abraham, C.E. Fishman, R. Forteza, A. Ahmed, A. Cortes, R.L. Warne, W.R. Moore, and R.D. Tanaka (1995) *Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep*. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(6 Pt 1): p. 2076-83.
147. Sylvén, H., M. Dahlback, I. Van Der Ploeg, and K. Alving (2002) *The tryptase inhibitor APC-366 reduces the acute airway response to allergen in pigs sensitized to *Ascaris suum**. *Clin Exp Allergy*, 32(6): p. 967-71.
148. Oh, S.W., C.I. Pae, D.K. Lee, F. Jones, G.K. Chiang, H.O. Kim, S.H. Moon, B. Cao, C. Ogbu, K.W. Jeong, G. Kozu, H. Nakanishi, M. Kahn, E.Y. Chi, and W.R.

- Henderson, Jr. (2002) *Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model*. J Immunol, 168(4): p. 1992-2000.
149. Rothmund, S., F.D. Sonnichsen, and T. Polte (2013) *Therapeutic potential of the peptide leucine arginine as a new nonplant Bowman-Birk-like serine protease inhibitor*. J Med Chem, 56(17): p. 6732-44.
150. Liang, G., S. Aldous, G. Merriman, J. Levell, J. Pribish, J. Cairns, X. Chen, S. Maignan, M. Mathieu, J. Tsay, K. Sides, S. Rebello, B. Whitely, I. Morize, and H.W. Pauls (2012) *Structure-based library design and the discovery of a potent and selective mast cell beta-tryptase inhibitor as an oral therapeutic agent*. Bioorg Med Chem Lett, 22(2): p. 1049-54.
151. Janke, D., C.P. Sommerhoff, and N. Schaschke (2011) *The arginine mimicking beta-amino acid beta(3)hPhe(3-H(2)N-CH(2)) as S1 ligand in cyclotheonamide-based beta-tryptase inhibitors*. Bioorg Med Chem, 19(23): p. 7236-43.
152. Wright, C.D., A.M. Havill, S.C. Middleton, M.A. Kashem, D.J. Dripps, W.M. Abraham, D.S. Thomson, and L.E. Burgess (1999) *Inhibition of allergen-induced pulmonary responses by the selective tryptase inhibitor 1,5-bis-[4-[(3-carbamimidoyl-benzenesulfonylamino)-methyl]-phenoxy]-pentane (AMG-126737)*. Biochem Pharmacol, 58(12): p. 1989-96.
153. Krishna, M.T., A. Chauhan, L. Little, K. Sampson, R. Hawksworth, T. Mant, R. Djukanovic, T. Lee, and S. Holgate (2001) *Inhibition of mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 107(6): p. 1039-45.
154. Decker, T. and M.-L. Lohmann-Matthes (1988) *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. Journal of Immunological Methods, 115(1): p. 61-69.
155. Sigma-Aldrich *Product Specification Pefabloc SC*. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/pefbul.pdf>.
156. Laidlaw, T.M., J.W. Steinke, A.M. Tinana, C. Feng, W. Xing, B.K. Lam, S. Paruchuri, J.A. Boyce, and L. Borish (2011) *Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcεRI*. J Allergy Clin Immunol, 127(3): p. 815-22 e1-5.
157. Bischoff, S.C. (2007) *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data*. Nat Rev Immunol, 7(2): p. 93-104.
158. Butterfield, J.H., D.A. Weiler, L.W. Hunt, S.R. Wynn, and P.C. Roche (1990) *Purification of tryptase from a human mast cell line*. J Leukoc Biol, 47(5): p. 409-19.
159. Schwartz, L.B. (2006) *Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue*. Methods Mol Biol, 315: p. 53-62.
160. Soto, D., C. Malmsten, J.L. Blount, D.J. Muilenburg, and G.H. Caughey (2002) *Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase*. Clin Exp Allergy, 32(7): p. 1000-6.
161. Thomas, P.S., R.E. Schreck, S.J. Ruoss, and S.C. Lazarus (1991) *Heterogeneity of intact granules purified from canine mastocytoma cell lines*. Am J Physiol, 260(2 Pt 1): p. L153-60.
162. Smith, T.J., M.W. Hougland, and D.A. Johnson (1984) *Human lung tryptase. Purification and characterization*. J Biol Chem, 259(17): p. 11046-51.
163. Schwartz, L.B., A.M. Irani, K. Roller, M.C. Castells, and N.M. Schechter (1987) *Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells*. J Immunol, 138(8): p. 2611-5.
164. Schwartz, L.B. and T.R. Bradford (1986) *Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer*. J Biol Chem, 261(16): p. 7372-9.

165. Alter, S.C., D.D. Metcalfe, T.R. Bradford, and L.B. Schwartz (1987) *Regulation of human mast cell tryptase. Effects of enzyme concentration, ionic strength and the structure and negative charge density of polysaccharides*. Biochem J, 248(3): p. 821-7.
166. Lindstedt, K.A., J.O. Kokkonen, and P.T. Kovanen (1998) *Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans*. Biochim Biophys Acta, 1425(3): p. 617-27.
167. Caughey, G.H., S.C. Lazarus, N.F. Viro, W.M. Gold, and J.A. Nadel (1988) *Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines*. Immunology, 63(2): p. 339-44.
168. Chan, H., E.B. Springman, and J.M. Clark (1998) *Expression and characterization of human tissue kallikrein variants*. Protein Expr Purif, 12(3): p. 361-70.
169. Alter, S.C., J.A. Kramps, A. Janoff, and L.B. Schwartz (1990) *Interactions of human mast cell tryptase with biological protease inhibitors*. Arch Biochem Biophys, 276(1): p. 26-31.
170. Schwartz, L.B., H.K. Min, S. Ren, H.Z. Xia, J. Hu, W. Zhao, G. Moxley, and Y. Fukuoka (2003) *Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 cells, Mono-Mac-6 cells, and human skin-derived mast cells*. J Immunol, 170(11): p. 5667-73.
171. Mahmood, T. and P.C. Yang (2012) *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 4(9): p. 429-34.
172. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman (2012) *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 40(Database issue): p. D343-50.
173. Sigma-Aldrich *N- α -TOSYL-L-LYSINE CHLOROMETHYL KETONE HYDROCHLORIDE*. Sigma Prod. No. T7254. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t7254pis.pdf.
174. Sigma-Aldrich *Product Information Benzamidine hydrochloride*. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/43/434760/434760-BULK_____SIAL_____.pdf.
175. Sturzebecher, J., D. Prasa, and C.P. Sommerhoff (1992) *Inhibition of human mast cell tryptase by benzamidine derivatives*. Biol Chem Hoppe Seyler, 373(10): p. 1025-30.
176. Eick, S., M. Puklo, K. Adamowicz, T. Kantyka, P. Hiemstra, H. Stennicke, A. Guentsch, B. Schacher, P. Eickholz, and J. Potempa (2014) *Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefevre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis*. Orphanet J Rare Dis, 9: p. 148.
177. Klemba, M., I. Gluzman, and D.E. Goldberg (2004) *A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation*. J Biol Chem, 279(41): p. 43000-7.
178. Ruchel, R. (1977) *Two-dimensional micro-separation technique for proteins and peptides, combining isoelectric focusing and gel gradient electrophoresis*. J Chromatogr, 132(3): p. 451-68.
179. Choe, Y., F. Leonetti, D.C. Greenbaum, F. Lecaille, M. Bogyo, D. Bromme, J.A. Ellman, and C.S. Craik (2006) *Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities*. J Biol Chem, 281(18): p. 12824-32.
180. Barrett, A.J., A.A. Kembhavi, M.A. Brown, H. Kirschke, C.G. Knight, M. Tamai, and K. Hanada (1982) *L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L*. Biochem J, 201(1): p. 189-98.
181. Methot, N., D. Guay, J. Rubin, D. Ethier, K. Ortega, S. Wong, D. Normandin, C. Beaulieu, T.J. Reddy, D. Riendeau, and M.D. Percival (2008) *In vivo inhibition of*

- serine protease processing requires a high fractional inhibition of cathepsin C.* Mol Pharmacol, 73(6): p. 1857-65.
182. Methot, N., J. Rubin, D. Guay, C. Beaulieu, D. Ethier, T.J. Reddy, D. Riendeau, and M.D. Percival (2007) *Inhibition of the activation of multiple serine proteases with a cathepsin C inhibitor requires sustained exposure to prevent pro-enzyme processing.* J Biol Chem, 282(29): p. 20836-46.
183. Li, P., G. Zheng, Y. Yang, C. Zhang, P. Xiong, Y. Xu, M. Fang, Z. Tan, F. Zheng, and F. Gong (2010) *Granzyme B is recovered by natural killer cells via clathrin-dependent endocytosis.* Cell Mol Life Sci, 67(18): p. 3197-208.
184. Nielsen, M.S., C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, and C.M. Petersen (1999) *Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase.* J Biol Chem, 274(13): p. 8832-6.
185. Coutinho, M.F., M.J. Prata, and S. Alves (2012) *Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction.* Mol Genet Metab, 105(4): p. 542-50.
186. Ghosh, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld (2003) *Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale.* Nat Rev Mol Cell Biol, 4(3): p. 202-12.
187. Gregory, A.D., P. Hale, D.H. Perlmutter, and A.M. Houghton (2012) *Clathrin pit-mediated endocytosis of neutrophil elastase and cathepsin G by cancer cells.* J Biol Chem, 287(42): p. 35341-50.
188. Lim, J.P. and P.A. Gleeson (2011) *Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps.* Immunol Cell Biol, 89(8): p. 836-43.
189. Futaki, S., I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, and A.T. Jones (2007) *Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms.* Biochem Soc Trans, 35(Pt 4): p. 784-7.
190. El-Sayed, A. and H. Harashima (2013) *Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis.* Mol Ther, 21(6): p. 1118-30.
191. Li, J., H.M. Petrassi, C. Tumanut, B.T. Masick, C. Trussell, and J.L. Harris (2009) *Substrate optimization for monitoring cathepsin C activity in live cells.* Bioorg Med Chem, 17(3): p. 1064-70.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der AG Klinische Biochemie/Proteolyse am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Ludwig-Maximilians Universität, München angefertigt.

Ich danke dem Direktor, Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff für die Themenstellung, die sehr gute Betreuung der Arbeit und seine fachliche Unterstützung. Insbesondere während der Anfertigung der Dissertation war er mir durch seine Geduld und Verbesserungsvorschläge von großer Hilfe. Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Norbert Schaschke, Hochschule Aalen, für die Bereitstellung zahlreicher Inhibitoren.

Den Kollegen unserer Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen konstruktiven Ideen und stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Erika Siepmann, Maresa Grundhuber und Stefan Simon, die mir die Arbeitsweisen im Labor beigebracht haben und immer speziell für meine Aufgabenstellung eine besondere Hilfe waren. Außerdem danke ich allen Beteiligten aus meinem Freundes- und Familienkreis, die mich insbesondere bei der Niederschrift dieser Arbeit unterstützt und immer wieder motiviert haben. Unter diesen Personen danke ich meinem Vater ganz besonders.

